

**3D-Hydrogele als Interaktionsmatrix für eine Chip-basierte  
DNS-Spurenanalytik in Vor-Ort-Anwendung**

**Dissertation**

**(kumulativ)**

Zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium*

(Dr. rer. nat.)



---

seit 1558

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Chemiker Antje Beyer

geboren am 02. November 1981 in Bad Muskau

Gutachter

1.

2.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Zusammenfassung

1.1. Wegweisende Meilensteine, Stand der Technik und Motivation

1.2. Eigene Forschungsergebnisse

1.2.1. Zeit- und Ressourcen-sparende Ein-Schritt-Synthese für funktionsbereite  
Hydrogel-Chips

1.2.2. Parameteroptimierung für maximale Hybridisierungseffizienz

1.2.3. Einfache 3D-Hydrogel DNS-Detektion mit bloßem Auge

1.2.4. Vor-Ort *E. coli* Detektion aus einer komplexen Matrix durch kombinierte  
direkte Hydrogel-PCR

1.3. Schlussfolgerungen

## 2. Veröffentlichungen

2.1. Hydrogel decorated chips for convenient DNA test

2.2. Fast-track, one-step *E. coli* detection: a miniaturized hydrogel array permits specific  
direct PCR and DNA hybridization while amplification

2.3. Easy Daylight Fabricated Hydrogel Array for Colorimetric DNA Analysis

## 3. Konferenzbeiträge

3.1. Vorträge

3.1.1. Hydrogele für Chip-basierte DNS-Detektion

3.1.2. 3D-hydrogel-matrix for improved bioanalytical applications

3.1.3. 3D-Reaktionsmatrix für eine schnelle Bioanalytik

3.1.4. 3D-Hydrogele für DNS-Spurenanalytik mittels elektrisch-auslesbarem  
Mikrofluidik-Chip-System

3.1.5. 3D-hydrogel-matrix for improved bioanalytical applications

3.1.6. Biomedical Application of Hydrogel Chip Interfaces in DNA Detection

3.1.7. Easy daylight polymerized hydrogel array for naked eye DNA-detection

3.1.8. Hydrogel Interface for DNA Test

3.2. Poster

3.2.1. 3D-surface on chips for electrical detection of DNA

3.2.2. Easy and fast chip-based detection of biomolecules

**4. Abkürzungsverzeichnis**

**5. Danksagung**

**6. Literaturverzeichnis**

## **1. Zusammenfassung**

### **1.1. Wegweisende Meilensteine, Stand der Technik und Motivation**

Des Menschen innewohnende größte Kraft ist seine Fähigkeit zur Erkenntnis und Verstehen seiner selbst und des ihn umgebenden Systems. Dabei ist die Suche nach seinem Platz und Ursprung die tiefgreifende Frage, die ihm von seinem Anfang den Ansporn zur Forschung gab. Auf diesem Weg entdeckte er komplexe Zusammenhänge der Natur und machte sich die darin gefundenen Gesetzmäßigkeiten zunutze um der nobelsten, sinnvollsten und erfüllendsten Aufgabe nachzugehen: das menschliche Leben in seiner Fülle zu erhalten und zu bereichern. So ist jede zeitliche und finanzielle Anstrengung zur Lösung von Fragestellungen aus den Bereichen der Lebens- und Umweltwissenschaften sowie der Medizin ein Akt der Forschung und Hilfsbereitschaft. In dem Bestreben der Zukunftssicherung in diesem gesellschaftlich relevanten Bereich erforscht das Leibniz-Institut für Photonische Technologien Jena dazu die wissenschaftlichen Grundlagen, Verfahren und Systeme. Unter dessen Motto „From Ideas to Instruments“ schließt sich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit einer erfolgreichen Geschichte der Forschung an; angefangen von der Aufstellung, Prüfung und Diskussion grundlegender Prinzipien der Naturwissenschaft hin zu neuen Erkenntnissen und deren direkte praktische Anwendung für die Verbesserung der Medizintechnik und Bioanalytik.

Die Komplexität der Spezialisierung der heutigen Naturwissenschaften stieg dabei in den letzten Jahrzehnten exponentiell an und erschwert damit die Verständigung der verschiedenen Disziplinen. Um medizinische Methoden heutzutage zu verbessern, ist die kreative Zusammenarbeit von Wissenschaftlern verschiedener Spezialfächer unerlässlich. Der hilfreichste Anker für die angestrebte interdisziplinäre Kommunikation und effizient/effektive Zielumsetzung ist dafür die gemeinsame naturwissenschaftliche Geschichte. Sie ist eine reichhaltige Quelle der Inspiration für den, der die Gedankengänge vergangener exzellenter Forschungsarbeit nachvollzieht und die so verstandenen Erkenntnisse kreativ für neue Fragestellungen anwendet. Die in dieser Arbeit beschriebenen Erfolge wären nicht möglich ohne die Vorarbeit solch kreativer Forscher.

Mit der Entdeckung der mendelschen Regeln der Vererbung durch Gregor Mendel 1866<sup>[1]</sup> und den immer weiter entwickelten Möglichkeiten der chemischen Analyse und Strukturaufklärung, entstand eine größer werdende Faszination um die Aufklärung des Ursprungs des Menschen. Heutzutage schauen Forscher respektvoll zurück auf die

zukunftsweisenden Erkenntnisse durch die Isolierung des „Nuklein“ aus Lymphozyten durch Friedrich Miescher 1869, die daraus gewonnenen Proteine und Nukleinsäuren durch Richard Altmann 1889,<sup>[2]</sup> die Identifizierung dieser Nukleinsäuren als die vier Basen Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin durch Albrecht Kossel 1896, die Aufklärung der weiteren Bestandteile der DNS als Zucker und Phosphatrest durch Phoebus Levene 1919<sup>[3]</sup>, den Nachweis der Übertragung der erblichen Information in Bakterien mittels dieser DNS durch Oswald Avery 1943<sup>[4]</sup> bis hin zur Aufklärung der Anordnung dieser DNS-Bestandteile und deren helikale Struktur durch James Watson und Francis Crick 1953.<sup>[5, 6]</sup>

Diese aufeinander aufbauenden und ineinander greifenden Erkenntnisse gaben den Startschuß für eine rasante Entwicklung der Grundlagenforschung hin zu aussagekräftigen verifizierenden Nachweis- und Messmethoden. Die Elektronenmikroskopie enthüllte, dass in der Übergangsregion nur 2 komplett denaturierte einzelne DNS-Moleküle unterschieden werden können, die DNS bei Erhitzen also nicht in einzelne Basen aufgespalten wird. Und dass sie dabei von den Enden des Doppelstrangs in eine willkürliche Knäuelstruktur übergeht.<sup>[7]</sup> Ein solcher Übergang wiederum ließ sich durch eine Änderung der Absorption nachweisbar machen.<sup>[8]</sup>

Dieses sogenannte Schmelzen der DNS bedarf der Spaltung zwei verschiedener Paare von Basen mit unterschiedlich vielen Wasserstoffbrückenbindungen. Im Falle von Adenin/Thymin (A/T) bedarf es des Trennens von zwei Wasserstoffbrücken und bei Guanin/Cytosin drei. Aufgrund von Paulings Untersuchungen<sup>[9]</sup> wurde erwartet, dass diese Paare unterschiedlich zur Stabilität der Helix beitragen und daher ihre Schmelztemperatur von dem Verhältnis der verschiedenen Paare in dem denaturierenden DNS-Abschnitt abhängt. Dies wurde von Marmur 1959 bestätigt. Weiter verfolgte er Untersuchungen des Übergangsprofils der Absorption mit steigender Temperatur<sup>[10]</sup> und konnte feststellen, dass reine A/T-DNS den gleichen scharfen Übergang zeigt wie die DNS in *Diplococcus pneumoniae* und daher eine fast identische Zusammensetzung haben muss.

Dieses Verfahren repräsentiert die erste rudimentäre DNS-Analyse aufgrund der Basenpaarung. Später entdeckten Marmur und Doty die spezifische Reformation aktiver doppelsträngiger DNS nachdem Hitze denaturierte DNS langsam abgekühlt wird.<sup>[11, 12]</sup> Diese Renaturierung erfolgte nur zwischen DNS-Strängen die von den gleichen oder nahe verwandten Organismen stammten. 1961 beschrieb Marmur erstmalig die optimalen Bedingungen für die Renaturierung der DNS zur Wiederherstellung ihrer transformierenden Wirkung, physikalischen, chemischen und immunologischen Eigenschaften.<sup>[13]</sup>

So gut wie mathematisch grafische Berechnungen die naturwissenschaftliche Wirklichkeit widerspiegeln, bleibt eine bildgebende Technik immer ein nützliches Instrument. Schon 1956/1958 berichteten Volkin und Astrachan auf mathematischem Wege, dass *E. coli* Bakterien nach Infizierung mit viraler DNS der Bakteriophage T2 nun andere RNS synthetisierte, die in ihrem Basenverhältnis dem der T2-DNS entspricht.<sup>[14]</sup>

Um diese Entdeckung zu beweisen, beschrieb Hall 1961 ein Vorgehen zur visuellen Detektion dieser komplementären Nukleotid-Sequenzen.<sup>[15]</sup> Dazu markierte er T2-RNS mit <sup>32</sup>P- und die T2-DNS, von der das RNS-Transkript stammte, mit <sup>3</sup>H-Isotopen. Die emittierten  $\beta$ -Partikel unterscheiden sich in ihrer Energie und konnten deshalb mit einem Szintillationsspektrometer nebeneinander nachgewiesen werden.<sup>[16]</sup> Die Daten zeigten, dass tatsächlich spezifische Komplexe zwischen T2-RNS und seiner homologen DNS gebildet werden und damit die beiden Sequenzen für die Bildung der Duplexformation eine Art Komplementarität besitzen mussten. Infolgedessen postulierte Hall schon damals RNS als möglichen Transportträger für Information vom Ort des genetischen Materials zu einem Ort der Proteinsynthese.

Aufgrund dieser Befunde wurden rasch weitere analytische Methoden basierend auf molekularer Hybridisierung entwickelt. So untersuchten verschiedene Gruppen die Interaktion von RNS-Molekülen mit ihrer komplementären DNS-Sequenz durch Zählung der Szintillation der radioaktiven RNS. Wobei aus verschiedenen Gründen beide Makromoleküle in Lösung vorlagen,<sup>[15, 17]</sup> aber oft günstigerweise die DNS auf einer soliden oder semisoliden Matrix<sup>[18, 19]</sup> oder auf einer Membran aus Nitrocellulose fixiert wurde.<sup>[20]</sup> Die dadurch gesammelten Daten verstärkten damit die Hypothese, dass der RNS-DNS-Komplex aus jeweils einem RNS- und DNS-Einzelstrang gebildet wird.

Um 1970 entdeckten Pardue, Gall und Jones einen Weg die Position spezifischer Sequenzen im Zellkern oder Chromosomen zu lokalisieren.<sup>[21, 22]</sup> Für diese *in situ*-Hybridisierung markierten sie RNS- oder DNS-Proben mit den radioaktiven Isotopen <sup>3</sup>H oder <sup>125</sup>I. Diese sequenzkomplementären Proben wurden mit dekondensierten Chromosomen hybridisiert und die Position der Sequenz durch lichtmikroskopische Autoradiographie bestimmt. Diese Schwarzweißbilder machten es möglich den Zellkern und die Chromosomen der Eierstöcke der Krötenart *Xenopus* während der Metaphase darzustellen, wobei die hybridisierte radioaktiv markierte DNS deutlich als schwarze Punkte im Zentrum der Chromosomen erkennbar wurde.<sup>[21]</sup> Auf gleiche Weise machte man so auch Tritium-markierte c-RNS in Speicheldrüsen-Chromosomen der *Drosophila* sichtbar.<sup>[22]</sup>

Diese Methode wurde später durch die Entdeckung der Multifarb-Fluoreszenz-Markierungstechniken<sup>[23, 24]</sup> als Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) bekannt. Southern schreibt in seinem Review über die Geschichte der Entstehung von Mikroarrays, dass obwohl rekombinante DNS-Methoden in den 1970er Jahren entwickelt wurden und obwohl ihr großes Potential weit anerkannt wurde, dennoch Untersuchungen zur Detektion spezifischer Sequenzen in rekombinanten Klonen nötig waren.<sup>[25]</sup> Weiter schreibt er, dass Grunstein und Hogness<sup>[26]</sup> die Mittel lieferten dies zu tun, und zwar durch direkte molekulare Hybridisierung mit lysierten Bakterienkulturen, die an einer Membran fixiert vorliegen. Die daraus durch Benton und Davis<sup>[27]</sup> abgeleitete Methode für *phage plaques* hatte später einen gewaltigen Einfluss auf die Entdeckung von neuen Genen.

Bis dato war die Analyse der Hybridisierung beschränkt auf mathematische, graphische und bildgebende Methoden, ohne dass die tatsächliche Basenreihenfolge bekannt war. 1977 gelang es Maxam, die DNS durch eine chemische Prozedur zu sequenzieren, bei der terminal-markierte DNS-Moleküle partial an jeder wiederholenden Base gebrochen werden. Die so markierten Fragmente wurden durch Elektrophorese in einem Polyacrylamid-Gel ihrer Länge entsprechend aufgetrennt.<sup>[28]</sup> Das Muster der radioaktiven Banden diente dann zur Bestimmung der Sequenz. Diese Technik erlaubte die Auslesung der Basenabfolge von bis zu 100 Basen. Durch die Entdeckung von rekombinanten DNS-Methoden<sup>[29]</sup> wurde es möglich mit überlappendem Hybridisierungsscreening<sup>[30]</sup> größere Sektionen der Chromosomen zu isolieren die auch nicht transkribierte Regionen einschlossen, in die geklonte Gene eingebettet sind.

Mit der Aufklärung der Basensequenzen und der Hybridisierungsbedingungen war nun der entscheidende Grundstein für die Entwicklung schneller Vor-Ort-DNS-Analysemethoden gelegt. Auch die Fortschritte auf dem Gebiet der organischen Chemie leisteten einen entscheidenden Beitrag dafür. So leitete die Erfindung der Festphasensynthese durch Merrifield 1969<sup>[31]</sup> die Herstellung der Nukleinsäuren auf diesem Wege ein.<sup>[32-35]</sup> Zusammen mit den bahnbrechenden Arbeiten über die Fabrikation komplexerer Nukleinsäuren wurde die Entwicklung begünstigt bis hin zur automatisierten Synthese von Polynukleotiden jedweder Zusammensetzung. Synthetische Oligonukleotide dienten damit schon 1979 zur Hybridisierung und Analyse von Mutationen.<sup>[36]</sup>

Der erste DNS-Test und Vorreiter der Mikrochips ist der 1979 von Kafatos beschriebene Dot-Blot,<sup>[37]</sup> der als einfache optische Analysemethode bis heute zahlreiche Anwendung findet. Verschiedene Proben geklonter DNS identischer Menge wurden dafür auf Filtern aus Nitrocellulose in Punkte konstanten Durchmessers gespottet. Der Filter wurde danach mit einer



radioaktiven RNS- oder DNS-Lösung korrespondierender Sequenz in unbekannter Proportion hybridisiert. Die Sättigung der Filter-gebundenen DNS musste dabei verhindert werden. Nach anschließender Autoradiographie konnte das Ausmaß der Hybridisierung semi-quantitativ durch visuellen Vergleich zu einer Standard-Verdünnungsreihe evaluiert werden.

Der Mechanismus der Anbindung der Fänger-DNS an Nitrocellulose ist unspezifisch. Um das Anbinden der Ziel-DNS zu verhindern musste ein Blocking-Schritt von mindestens einer Stunde in 10x Denhardt's Lösung durchgeführt werden. Diese ist eine Mischung von Polymeren mit hohem Molekulargewicht bestehend aus Ficoll (ein synthetisches Polymer der Saccharose), Polyvinylpyrrolidon und Rinderserum.

Der erste Dot-Blot zeigte so verschieden große schwarze Punkte nach der Hybridisierung intakter mRNS verschiedener Stadien der Choriogenese an punktuell gebundener Chorion-cDNS-Klone und bewies damit die stärkere Bindung von Sequenzen mit mehreren Mismatches nach einem Abschmelzen bei 50°C gegenüber der Bindung von identischeren Sequenzen bei 68°C.<sup>[37]</sup>

Nach der Entdeckung und Lokalisierung von einzelnen Genen begann um 1977 mit der Entwicklung von Methoden zur Sequenzierung<sup>[28, 38]</sup> der DNS die Aufschlüsselung eines gesamten Genoms. Als erste vollständige Sequenz entschlüsselte man so die DNS eines Bakteriophagen.<sup>[39]</sup> Diese Methode führte mit modernen hochparallelen Sequenzierungsmethoden zu zahlreichen Anwendungen in der Genetik. DNS-Analysen werden heute zu einer Vielzahl von Zwecken durchgeführt: in der Kriminologie zur Identifizierung eines Täters, in der Klärung von Verwandtschaftsfragen, in der medizinischen Diagnostik um genetische Grundlagen einer bestehenden Krankheit aufzuklären und Prädispositionen für Krankheiten zu untersuchen und in Lebensmittelkontrollen zur Erkennung genetisch manipulierter Sorten und Qualitätssicherung. Doch die Forschung konnte diesen Stand nur erreichen, weil es möglich wurde, gewünschte Teile der DNS in leicht detektierbare Mengen zu vervielfältigen.

Dazu leisteten Kjell Kleppe (1971) und besonders Kary Mullis (1985) den entscheidenden Beitrag. Sie entwickelten ein Vorgehen, Stücke der DNS durch das im Zellkern dafür verantwortliche Enzym (Polymerase) im Labor zu vervielfältigen.<sup>[40, 41]</sup> Diese Methode ist als Polymerase-Kettenreaktion (englisch *Polymerase Chain Reaction*, PCR) bekannt geworden. Der zugrundeliegende Mechanismus startet mit einer „Ziel-Sequenz“, einem kleinem Segment der DNS. Diese kann in wenigen Stunden millionenfach kopiert werden. Dazu wird der

Doppelstrang durch Hitze aufgetrennt. Zwei kleine synthetische DNS-Stücke, die jeweils komplementär zu einem Ende der Ziel-Sequenz sind, dienen als Primer. Sind diese angebunden, startet die Polymerase dort jeweils die Replikation des Stranges. Die anfänglich eingesetzte DNS-Menge wird so mit jedem weiteren Schritt exponentiell gesteigert.

Das dafür verwendete Enzym Polymerase aus *E. coli* musste wegen seiner Hitzesensitivität nach jedem Denaturierungsschritt erneut zugegeben werden. Mit der Einführung eines Cyclers konnte die langwierige manuelle Temperaturregelung beschleunigt werden. Aber es war die Anwendung der Polymerase des Heißquellen-Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq),<sup>[42, 43]</sup> dass die Automatisierung der PCR letztlich möglich machte. Da nun ein erneutes Zugeben von Enzym unnötig wurde, konnte erstmalig die komplette PCR-Amplifikation in einem einzigen zeitsparenden Prozeß ohne Öffnen des Reaktionsgefäßes erreicht werden. Seitdem hat sich diese Methode als eine zunehmend leistungsfähige, vielseitige und nützliche Technik etabliert. Mithilfe der PCR können winzige Teile eingebetteter, oft verborgener, genetischer Information zu zugänglich großen Mengen vermehrt und damit identifiziert werden. So liefert bereits eine einzige Zelle genügend Material für eine Analyse. Daher konnte als erste Anwendung die Diagnose der genetischen Krankheit Sichelzellenanämie verbessert werden, weil die PCR-Methode mit sehr viel weniger klinischem Material funktionierte als die damaligen Standardmethoden. Weitere Anwendungen sind der Nachweis von Spuren von genetischem Material (weniger als 10 Replikate eines DNS-Stranges) in Blut, Zellen, Wasser, Nahrungsmittel und anderen klinischen und umweltrelevanten Proben. Besonders wichtig ist der Beitrag der PCR zum Nachweis von Pathogenen, die schwer oder unmöglich zu kultivieren sind, wie den Verursacher von Borreliose und AIDS. Mit diesen Vorzügen ist die PCR bis heute aus analytischen Laboren nicht mehr weg zu denken.

Die vormals eingesetzten radioaktiven <sup>31</sup>P- und <sup>135</sup>I-Markierungen für den DNS-Nachweis waren sehr instabil und bedurften spezieller Handhabung wegen ihres Risikos für den Anwender. Enzyme waren für ihre Eignung als Nachweissubstanz durch Redoxreaktion bekannt, es fehlte allerdings an einer Möglichkeit, selbige einfach und spezifisch an die Ziel-Sonde zu binden.

Aufgrund des 1962 von Green erstellten Befundes des hohen Grades an Affinität und Spezifität der nichtkovalenten Bindung zwischen Avidin und Biotin<sup>[44]</sup>, erhielt diese Anbindungsmethode erfolgreich Einzug.

Es war Esmond E. Snell, der 1940 die starke Affinität zwischen Avidin und Biotin entdeckte. Er berichtete über den Fund, dass Biotin *in vitro* durch kommerzielles Albumin (Eiklar-Proteine) inaktiviert werden kann.<sup>[45, 46]</sup> Ihm gelang es als Erstem, das komplexbildende Protein, dass 0,05 Prozent des Eiklar-Proteins ausmacht zu isolieren und benannte es Avidin nach der Eigenschaft, sich "gierig" (engl. "avid") mit Biotin zu verbinden.

Seit der Entwicklung des *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* (ELISA)<sup>[47, 48]</sup> im Jahr 1971, findet dieser Mechanismus wegen seiner einfachen Durchführbarkeit und sehr guten Resultate bis heute Anwendung. Dazu nutzt man nach wie vor oft biotinylierte sekundäre Antikörper, um das gesuchte Antigen zu binden gefolgt von der Detektion über ein Steptavidin konjugiertes Reportermolekül wie Meerrettich-Peroxidase (HRP) oder alkalischer Phosphatase (AP).

Diese nicht radioaktive Markierungsmethode machte man sich später auch zur Nukleinsäuredetektion zunutze. Dazu gehört die elektronenmikroskopische Visualisierung von Biotin-markierten tRNS-Genen mit Ferritin-Avidin.<sup>[49, 50]</sup> Nach der Entdeckung, dass Biotin-markierte Triphosphate enzymatisch in RNS und DNS eingebaut werden können und diese in Avidin-Sepharose selektiv gefangen werden<sup>[51]</sup>, erweiterte Leary 1983 das Repertoire genetischer Studien um einen kolorimetrischen Detektionsweg, den er Bio-Blot taufte.<sup>[52]</sup> Ein Avidin-biotinylierter alkalischer Phosphatase-Komplex induzierte dabei unter anderen eine Farbreaktion mit Toluidinblau nach Hybridisierung einer biotinylierten Probe an eine auf Nitrocellulose gebundene komplementäre Probe.

Leary war so imstande auch die Überlegenheit der Detektion mit einem Avidin/alkalische Phosphatase-Polymer gegenüber der Detektion via Avidin und biotinylierter HRP, Avidin-biotinylierte alkalische Phosphatase, und sogar dem Dot-Blot-Replikat derselben Hybridisierungsreaktion ist zu beweisen.<sup>[52]</sup> Damit war sein Bio-Blot nicht nur aus Sicht der Arbeitssicherheit durch die Verwendung von nicht radioaktiven Reagenzien dem Dot-Blot überlegen, sondern auch durch seine deutlich höhere Sensitivität. Denn unter vergleichbaren Bedingungen erbrachte er den Nachweis bis zu einer Menge von 8 pg der Ziel-Sequenz gegenüber 64 pg beim Dot-Blot.

Poröse Membranen, wie im Dot-Blot und Bio-Blot angewendet, boten einige Vorteile. Deren große Oberfläche, starke Saugkraft und geringe Spotdiffusionsverbreiterung ermöglichte das Aufbringen großer Volumina an DNS-Lösung. Die nicht kovalente Bindung der Fänger-Sonden an Membranen zeigte neben der guten Nutzbarkeit aber auch Nachteile.

So wurde zum Beispiel ein Ablösen des Analyten vom Substrat während der Hybridisierung beobachtet.<sup>[53, 54]</sup> Die Randbegrenzung und Form der Punkte der Dots ist schwer zu definieren und die Menge an abgelagerter DNS weder akkurat zu kontrollieren noch zu bestimmen. Weiterhin war eine Verkleinerung der Punkte über gewisse Grenzen hinweg nicht realisierbar. Diese Faktoren wurden allerdings entscheidend für eine automatische Auslesung der Signale. Die essentielle Präzision konnte nur durch Verwendung rigider Substrate erreicht werden. Deshalb wurde eine große Zahl an Anbindungsmethoden publiziert, welche in Anwendungsfreundlichkeit, Probendichte und Bindungsstabilität sehr verschieden sind.<sup>[55-78]</sup> Weniger gebräuchlich war die Fixierung von DNS an Sephadex (Dextran-Epichlorhydrin-Copolymer) oder Sepharose (Markenname für eine vernetzte, kugelförmige Agarose).<sup>[75, 77]</sup> Und obwohl Bünemann et al. für die gelartigen makroporösen 3D-Materialien eine beständig erhöhte Zugänglichkeit für eine Hybridisierung nachwiesen,<sup>[79, 80]</sup> fanden diese Matrices kaum weitere Anwendung. Denn die Aktivierung dieser Substrate war damals nur mit dem sehr giftigen Bromcyan erreichbar.

Unter den erfolgversprechendsten Festphasen-Fixierungsmethoden waren nach Rehman et al.<sup>[81]</sup> die zu finden, die Polyacrylamid-Harze als Substrate verwendeten.<sup>[64, 69, 74, 78, 82, 83]</sup> Attraktive Merkmale dieser vernetzten Medien sind ihre hydrophilen Eigenschaften, die Verfügbarkeit einer großen Auswahl an Porengrößen, hohe Anbindungskapazität, ihre erhöhte chemische und thermische Stabilität, geringe unspezifische Adsorption biologischer Makromoleküle und die Möglichkeit ihrer einfachen Derivatisierung mit reaktiven funktionellen Gruppen.<sup>[84]</sup> Khrapko et al. fanden bei der Suche nach besseren Sequenzierungsmethoden, dass eine 30 µm dicke Polyacrylamid-Gel-Schicht auf Glas als passender Träger für die Immobilisierung von Fänger-Sonden fungiert.<sup>[83]</sup> Sie waren damit die Pioniere der Verwendung von Polyacrylamid für die DNS-Immobilisierung. Sie aktivierten das Gel mittels Substitution einiger Amid- durch Hydrazid-Gruppen. Am 3'-Ende der Fänger-Sonden wählten sie das Nukleotid 3-Methyluridin, welches keine stabile Basenpaarung formen kann. Nach der Oxidation der OH-Gruppen von dessen Ribose-Einheit zu einer Aldehydgruppe konnte so der DNS-Strang über die Ausbildung eines Hydrazons am Gel gebunden werden. Diese DNS-Matrix überstand nach ihren Angaben mindestens 5 Hybridisierungs- und Wasch-Zyklen ohne erkennbare Verschlechterung der Hybridisierungseigenschaften.

Nun bedurfte es einer Erhöhung der Spotdichte. Mit den Dot-Blots wurde zwar die parallele Analyse multipler Sequenzen realisiert. Aber für die Sequenzierung ganzer Genome wurde eine weit höhere Parallelität erforderlich. Daher führte Maier 1992 das erste automatisierte Spotten

der DNS ein.<sup>[85]</sup> So gelang es ihm 14 Millionen Basenpaare verteilt auf 3 Chromosomen des Hefebakteriums *Schizosaccharomyces pombe* zu entschlüsseln. Diese Automatisierung erhöhte die Arbeitsgeschwindigkeit, verbesserte die Genauigkeit der Probenanordnung und reduzierte menschliche Fehler, die bei einer hohen Zahl an wiederholenden Prozeduren auftritt.

Obwohl die Immobilisierung von DNS-Molekülen mit den oben genannten Methoden möglich wurde, hatten sie allesamt den Nachteil, dass sie einer Aktivierung der Substrate/Gele, der DNS oder beider bedurften. In dem Bestreben eine Technik zur stabilen chemischen Anbindung von Primern zur Untersuchung von Festphasen-PCR-Methoden zu finden, initiierten Rehman et al. 1999 die Verwendung der gelbildenden Einheiten als copolymerisierende endständige Gruppe der DNS.<sup>[81]</sup> Oligonukleotide mit einer 5'-terminalen Acrylamidgruppe wurden dafür mit Acrylamid-Monomeren und Bis-Acrylamid gemischt und auf eine mit Acryl-Silan behandelte Glasoberfläche gegeben. Die Makromoleküle sind nach der Polymerisierung ohne einen weiteren Reaktionsschritt kovalent in die Gel-Matrix gebunden. Das Polymer selbst haftet an der aktivierten Oberfläche an mehreren Punkten durch dieselbe Acrylamid-Polymerisationsreaktion. Diese Copolymerisation zeigt laut Rehman et al. gegenüber vormaligen Präparationen signifikante Vorzüge. Zunächst kann sie mit weit genutzten Standard-Gel-Polymerisierungstechniken durchgeführt werden. Zweitens liefert sie Substrate mit einer sehr hohen Probendichte und drittens ist die Anbindung extrem stabil und übersteht die wechselnden Temperaturen der PCR-Zyklen. Überdies nutzten Rehman et al. im Zuge dieser Arbeit die Acrylamidgele nicht nur als 30 µm dicke Schicht<sup>[83]</sup> sondern in Form von Spots auf Glas. In dieser makroskopischeren Verwendung des vernetzten Polymers, konnte es erstmalig als Hydrogel bezeichnet werden und der entsprechende Spot-Array als erster DNS-Hydrogel-Chip identifiziert werden.

Der Raum zur Anbindung von Makromolekülen auf 2D-Oberflächen ist limitiert, was eine natürliche Begrenzung zu deren Beladung darstellt. Es wurde nachgewiesen, dass zum Beispiel die gleiche Konzentration an Antikörpern eine deutlich dichtere Beladung in einem 3D-Gel entgegen einer Oberfläche ergibt.<sup>[86]</sup> Diese Ergebnisse sind auf DNS-Makromoleküle übertragbar. Zusätzlich bewiesen Peterson et al. 2001, dass eine niedrige 2D-Probendichte eine 100%ige Hybridisierung dieser Fänger-Sonden ermöglicht, aber eine hohe 2D-Probendichte die Kinetik der Hybridisierung derart stören kann, dass die Effizienz der Strangpaarbildung bis auf 10% sinkt.

Die hochporöse, erweiterte Oberfläche der 3D-Hydrogele bietet dagegen eine hohe Kapazität, weite Abstände zwischen den fixierten Fänger-Sonden und eine weitestgehend homogene Hydrathülle für die Moleküle und mimt damit die Umgebung natürlicher biochemischer Prozesse in Zellen. Überdies wurde oben die bessere Zugänglichkeit der Hybridisierung in Gelen gegenüber Oberflächen erwähnt.<sup>[79]</sup> Demzufolge wurden Rehman's Arbeiten zur Copolymerisation durch viele Gruppen für verschiedene Anwendungen genutzt und weitergeführt.<sup>[87-100]</sup> Leicht abgewandelt sind die Arbeiten von Rubina et al., die die Copolymerisation sogar ohne Photoinitiator (PI) bei der Radikal-bildenden Wellenlänge von 365 nm der Methacrylamid-Bausteine selbst mit Bestrahlung von UV-Licht realisierten.<sup>[101]</sup> Sie entdeckten auch, dass unter diesen Bedingungen NH<sub>2</sub>-terminierter Oligonukleotide an den Vernetzer Bisacrylamid über eine Michael-Addition bindet. Und dies gelang mit einer Anbindungseffizienz von 80% bei einem pH-Wert von 10 gegenüber 1-2% bei einem pH-Wert von 7. Die Immobilisierungsrate bestimmten sie durch Vernetzung verschiedener Oligonukleotide mit unterschiedlichen Endgruppen zur Polymerisation innerhalb eines Gelblocks und nachfolgender Elektrophorese. So verblieb nur die immobilisierte DNS an ihrem Ursprungsort. Dabei zeigte sich auch, dass neben Acrylamid mit einer Immobilisierungseffizienz von 83% nur Methacrylamid (87%) eine gute Anbindung neben anderen Homologen gewährleistet. Wie bereits gezeigt, erlauben Hybridisierungstechniken mit markierter Ziel-DNS eine einfache, schnelle und simultane Analyse homologer DNS-Abschnitte. Dabei kann ein kurzer Strang Nukleinsäure (~20-100 Basenpaare) sowohl als Probe als auch als Proband genutzt werden. DNS-Mikroarrays wurden deshalb ein immer rasanter wachsendes Feld der Forschung und fanden zahlreiche Anwendungen.<sup>[102, 103]</sup>

Mit Verbesserung und Vereinfachung der Methoden wuchs die Vision zur Komprimierung und Automatisierung für eine mobile Analyse. Schnelltests sollten eine zeitoptimierte Diagnostik am Ort des Geschehens ermöglichen. Hierbei wurde eine dezentrale Diagnostik angestrebt, bei der nur ein bis zwei Stunden von der Probennahme bis zum Testergebnis vergehen sollen. Diese Methoden werden mit den Begriffen „*point-of-care-testing* (POCT)“<sup>[104]</sup> bzw. „*on-site detection*“ umrissen und finden Anwendung in der Humanmedizin, der Tiermedizin, dem Umweltmonitoring oder der Lebensmittelsicherheit. Im humanmedizinischen Kontext wird häufig von patientennaher Diagnostik gesprochen, d.h. direkt am Patientenbett, was besonders in Notfallambulanzen oder Intensivstationen bedeutsam ist, sowie beim Hausarzt oder beim Patienten zu Hause. Vorteile mobiler Diagnostiksysteme sind deutlich verkürzte Analysezeiten, was insbesondere dann ausschlaggebend ist, wenn in einem definierten Zeitfenster Interventionen erfolgen müssen. Beispiele hierfür wären die Festlegung einer Quarantäne bei

Seuchenausbruch oder die optimale Therapieoption für einen Patienten mit Verdacht auf Myokardinfarkt. Das ideale Gerät für den Vor-Ort-Einsatz ist portabel, einfach bedienbar, und robust und daher unter diversen Umgebungsbedingungen einsetzbar.<sup>[104-108]</sup>

Das Aufkommen von schnellen und anwenderfreundlichen POCT-Systemen ebnet den Weg für eine bessere Diagnostik und Kontrolle von Krankheiten. Damit ist es ein unverzichtbares Tool im Bereich der Lebenswissenschaften; im Speziellen der Bioanalytik. Die entscheidenden Weiterentwicklungen liegen dabei in der Simplifizierung der Arbeitsweise durch schnelle Prozesse in wenigen Arbeitsschritten. Dies soll durch die kreative Komprimierung komplexer Prozesse von Probennahme bis Auslesung zu simplen automatisierten Systemeinheiten erreicht werden. Weiter sollen in großer Anzahl produzierbare Einweg-Chips und Probeneinheiten eine Kostenreduzierung ermöglichen. Dadurch soll die Anwenderfreundlichkeit derart gesteigert werden, dass ungeschultes Personal und zukünftig der Patient selbst als Endnutzer dieses Gerät direkt zu Hause verwenden kann.

Zu den Vor-Ort-auftretenden Herausforderungen gehören zum Beispiel die Probenvorbereitung, daher die Extraktion von Zellen und die Aufreinigung der DNS aus komplexen Matrices. Verschiedene Wege wurden beschritten, um diesen Fragestellungen zu begegnen.

Beispielsweise können heutzutage sogar Tumorzellen direkt aus dem Urin angereichert werden, um eine frühzeitige Erkennung von Blasentumoren zu gewährleisten. Ein effektives Filtersystem mit einer Polycarbonat-Membranfilter-Einheit kann dabei einzelne Zellen aus dem großen Volumen mehrerer Toilettengänge retardieren.<sup>[109]</sup> Durch ein Pufferdepot der Filtereinheit kann die DNS bei Raumtemperatur so monatelang gelagert werden und bleibt für eine Analyse verwertbar. So können Patienten direkt Zuhause passende Proben selbst erstellen und für einen DNS-Test per Post einsenden.

Für eine Reinigung und gleichzeitige Anreicherung der DNS aus komplexen Medien wurden zum Beispiel poröse Membranen entwickelt, die mit dem multivalent kationischen Polymer Chitosan beschichtet wurden.<sup>[110]</sup> Diese Methode erlaubt die Isolierung von DNS aus einer Lösung und die direkte Einsetzung der DNS beladenen Membranen ohne weitere Aufreinigung in Downstream-Prozessen wie der quantitativen Echtzeit-PCR (englisch *real-time quantitative* PCR, kurz qPCR).

Aber auch die Isolierung aus festen komplexen Medien wie Stuhl wurde verbessert. In nur 20 min erfolgt dabei die Isolierung der DNS von *Clostridium difficile* mit Hilfe eines Polystyrol-

Streifens innerhalb eines Lyse-Mikroreaktors.<sup>[111]</sup> Der Streifen kann in eine PCR-Küvette mit Mastermix eingesetzt und die amplifizierte DNS über Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Eine weitere Herangehensweise für Vor-Ort-Anwendungen sind *Lateral Flow*-Tests und in diesem Falle besonders die kostengünstigen Papier-Streifentests.<sup>[112]</sup> Choi et al. folgern in ihrem Review zu Papier-Streifentest, dass dieser in Zukunft alle drei Arbeitsschritte von Extraktion über Amplifikation zu Detektion kombinieren soll. So sollen zukünftig einige Tropfen Blut als Laufmittel die DNS durch Kapillarkräfte durch poröses Papier ziehen. Dabei soll die DNS chromatographisch extrahiert und in einem Puffer-Reservoir isothermal vervielfältigt und markiert werden. Nach Hybridisierung an Fänger-DNS soll das spezifische Signal innerhalb einer Stunde ablesbar sein. Dennoch sind bisher keine kommerziell erhältlichen Test für spezifische Nukleinsäuren bekannt.

Weiter sind elektrochemische Sensoren ein verbreitetes Tool zur DNS-Detektion. Aktuell gehen in diesem Feld Bestrebungen in die Richtung die Oberfläche der Elektroden gegen Bio-Fouling zu schützen, um das Detektionslimit innerhalb komplexer Matrices zu senken. Zum Beispiel werden dafür poröse Goldelektroden in einem Selbstorganisationprozeß hergestellt.<sup>[113]</sup>

Eine andere Herangehensweise beschäftigt sich mit der Anpassung der PCR an POC-Situationen ohne Heiz- und Kühl-Elemente. Isothermale PCR ist ein weit bekanntes Schlagwort. Dabei kommen Methoden wie die Schleifen-vermittelte isothermale Amplifikation (LAMP)<sup>[114, 115]</sup> und die Helikase-abhängige Amplifikation (HDA) zum Einsatz. In Vor-Ort-Situationen kann die für die HDA erforderliche gleichbleibende Temperatur mit einem Heizapparat auf Grundlage des Erhitzens von Zeolithen mit Wasser überall erzeugt werden.<sup>[116]</sup> Die LAMP-Methode bringt einige Vorteile gegenüber der PCR hinsichtlich der Reaktionsgeschwindigkeit, Sensitivität und Amplikonmenge. Diese konnte seit neuestem auch mit einem mikrofluidischen System mit elektrochemischer Detektion kombiniert werden.<sup>[117, 118]</sup> Die Werkzeuge der Mikrofluidik ermöglichen ebenso die Zusammenfassung der Prozeßkette zu einem monolithischen Wegwerf-Artikel.<sup>[119, 120]</sup> In Verknüpfung mit der LAMP-Methode konnte nun eine Echtzeit-quantitative-elektrochemische-Detektion von 16 Kopien der genomischen DNS von *Salmonella enterica enterica* Typhimurium in weniger als einer Stunde nachgewiesen werden.<sup>[117]</sup>

Eine interessante Variante der Verkürzung der PCR ist die „ultraschnelle photonische PCR“.<sup>[121]</sup> Dabei wird plasmonische photothermale Licht-zu-Hitze-Konvertierung mittels

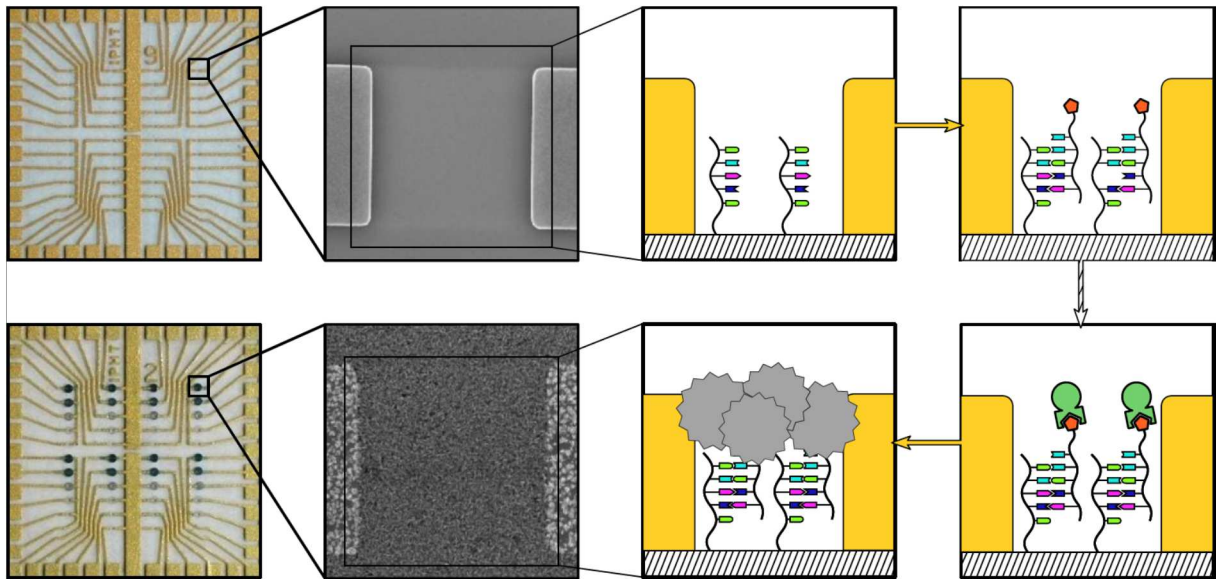


Photon-Elektron-Phonon-Kupplung genutzt. Dazu sind lediglich eine dünne Goldschicht auf dem Boden der Vertiefungen einer Standard-Mikrotiterplatte und handelsübliche Licht emittierende Dioden (LEDs, 450nm) nötig. Die Plasmonenanregung im Goldfilm erhitzt die umgebende Lösung auf über 150°C innerhalb von 3 Minuten. Auf diese Weise konnten 30 Thermozyklen von 55°C auf 95°C innerhalb von 5 Minuten erreicht und eine ultraschnelle DNS-Amplifikation durchgeführt werden. In Kombination mit dieser Methode werden auch PCR-abhängige Methoden für Vor-Ort-Anwendungen vorstellbar.

Eine alternative Version der Anpassung für patientennahe Diagnostik ist eine Umgestaltung der Detektionsmethode damit sie in ein bereits in der Anwendung befindliches Gerät integriert werden kann. So gelang es kürzlich ein Standard-Blutzuckermessgerät für die Detektion von HIV aus Blut zu adaptieren.<sup>[122]</sup> In einem Sandwich-Assay werden Invertase beladene Eisen(III)-Oxid/Goldnanopartikel auf der Sensoroberfläche gebunden. Nach Zugabe von Saccharose wird über die Invertase Glucose gebildet, die von dem Blutzuckermessgerät detektiert werden kann.

Wie gezeigt, sind verschiedenste Ansatzpunkte der Vereinfachung der Prozeßkette nötig, um in Zukunft ideale Lösungen für spezielle Vor-Ort-Tests zu gewährleisten. Die meisten der oben genannten Methoden beschränken sich auf eine Auslesung mittels Fluoreszenz.

Aber auch Nanopartikel-Marker fanden Anwendung auf Mikroarrays,<sup>[123-126]</sup> nachdem bewiesen war, dass sie die Bindung der komplementären Stränge nicht stören.<sup>[61, 62, 127]</sup> 2002 nutzten Park et al. Ziel-DNS funktionalisiert mit Gold-Nanopartikeln. Diese induzierten eine Silberabscheidung und schlossen einen Elektrodenspalt. Die DNS konnte auf diesem Wege in einer Änderung der elektrischen Leitfähigkeit nachgewiesen werden.<sup>[128]</sup> Man fand kurz darauf, dass Redoxenzyme zu einer ähnlichen Erzeugung von Silber-Nanopartikeln verwendet werden können (Enzyme metallography oder EnzMet).<sup>[129-132]</sup> Möller et al. kombinierten 2005 diese Enzym-gesteuerte Endsignalerzeugung mit der von Park et al. entwickelten Auslesung im Elektrodenspalt (Abbildung 1).<sup>[133]</sup> Weiterhin konnte eine kostengünstige Herstellung der Chips zur Aufbringung der Goldelektroden auf Glas mit Siebdruckverfahren etabliert werden. In Abbildung 1 ist der Reaktionsablauf in den Elektrodenlücken dargestellt.



**Abbildung 1:** Elektrisch/optische DNS-Detektion. Das Prinzip beruht hierbei auf der kovalenten Bindung von Fänger-Molekülen in einem Elektrodenspalt, die die gesuchte Biotin-markierten Oligonukleotide hybridisieren. Nachfolgend wird ein Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex gebunden, wodurch eine enzymatisch induzierte Silberabscheidung generiert wird. Durch die Silberpartikel wird der Elektrodenspalt überbrückt, was durch die Änderung der elektrischen Leitfähigkeit detektiert wird. Weiterhin ist eine optische Auswertung der Silberabscheidung über eine Grauwertanalyse möglich.

Der entscheidende Erfolg dieser Technik bestand in der erfolgreichen Reduzierung des Hintergrundsignals und einer daraus folgenden signifikant gesteigerten Sensitivität.<sup>[133, 134]</sup> Das portable System ist in Abbildung 2 dargestellt. Die beheizbare mikrofluidische Chipkammer (oben links) fungiert gleichzeitig als Leitfähigkeitsausleseeinheit. Die Proben- und Reagenzienzugabe auf den Elektrodenchip erfolgt über eine Schlauchpumpe (unten links) und ergibt zusammen mit einem PC oder Handy ein kompaktes POCT-Gerät.



**Abbildung 2:** Elektrisch optisches Auslese System mit Schlauchpumpe, Chip-Mikrofluidik-Kammer und Analysesystem (PC oder Handy) für eine Vor-Ort-DNS-Detektion.

Zusätzlich wurde das Verfahren erfolgreich für Anwendungen in der Identifikation der Tierseuchen Rauschbrand, Maul- und Klauen-Seuche<sup>[135]</sup> sowie zum Nachweis von Pflanzenpathogenen der Gattung *Phytophthora*<sup>[136]</sup> optimiert und getestet. Für Voll-Vor-Ort-Analysen wurde diese Technik in Verknüpfung mit einem vorgeschalteten portablen PCR-Chip<sup>[135]</sup> oder einer isothermalen transportfähigen PCR-Reaktor gebraucht.<sup>[116]</sup>

Wie schon beschrieben, bieten 2D-Oberflächen als Hybridisierungsgrenzfläche einige Nachteile. Demzufolge sollte im Rahmen der Forschung der vorliegenden Arbeit ausgehend von dieser etablierten elektrisch/optisch auslesbaren Detektionsplattform, die Erweiterung dieses Systems von 2D zu 3D durch die Implementierung von Hydrogel-Strukturen untersucht und neue alternative Methoden zur Verbesserung der Pathogendetektion in *Point-of-Care*-Untersuchungen mit Hydrogelen erschlossen werden. Hydrogele simulieren mit ihrem wasserreichen Netzwerk ideal die Umgebung der zellulären Matrix. Sie bieten daher DNS und Proteinen eine verbesserte Interaktionsmatrix als 2D-Oberflächen. Das um eine Dimension vergrößerte Anreichern der Fänger-Moleküle in der Gel-Matrix stellt den bedeutendsten Vorteil gegenüber der Anbindung auf 2D-Oberflächen dar.<sup>[137]</sup> Es wurde nachgewiesen, dass die Zugänglichkeit für die Hybridisierung der Oligonukleotide innerhalb eines Hydrogels größer ist als auf einer Oberfläche.<sup>[79]</sup> Weiter fand man sogar eine reduzierte Hybridisierungseffizienz bei hoher 2D-Beladung aufgrund des limitierten Raumes.<sup>[86, 138, 139]</sup> Deshalb ist auch eine Steigerung der Spezifität und Sensitivität der DNS-Analyse auf diesem Wege zu erwarten und soll im Zuge der Untersuchungen geprüft werden.

Es existieren eine Vielzahl möglicher natürlicher und synthetischer Monomer- und Vernetzer-Einheiten, deren Vernetzung Hydrogele erzeugt.<sup>[140]</sup> Verschiedene Forschergruppen verwendeten Hydrogele auch in anderer Form als Spots auf einer rigiden Oberfläche.<sup>[101, 141-144]</sup> So dienten sie als Oberflächen vergrößernde Matrix für DNS-Tests in Kristallfasern,<sup>[145]</sup> mikrofluidischen Kanälen,<sup>[146-151]</sup> als Film auf Glas oder<sup>[83, 152]</sup> auf Goldelektroden,<sup>[153]</sup> als Mikropartikel<sup>[89, 154]</sup> oder Pads.<sup>[87]</sup> Die Hydrogele müssen für die angestrebte Durchlässigkeit für den großen Enzymkomplex sehr großporig sein. Solch labile Gele sind als Partikel oder Pads schwer handhabbar und würden leicht zerreißen. Daher verbleiben Spots auf einer festen Oberfläche der Goldstandard und die Methode der Wahl für die Forschung in dieser Arbeit.

Dennoch stellt auch die Immobilisierung der Gele eine Herausforderung dar. Dies ist im Schwellverhalten der Hydrogele begründet. Besonders großporige Gele schwellen bei Wasseraufnahme leicht auf über ein 10-faches ihres Ausgangsvolumens. Einmal fixiert auf einer rigiden Oberfläche, ist das Schwellen der Gele auf 2 Dimensionen beschränkt. Ein solch

begrenztes Schwellen der Gele führt zu Spannungen im Polymergerüst und führt bei dünnen Hydrogel-Filmen<sup>[155]</sup> bereits zu Perturbationen und starken Verformungen bei Hydrogel-Zylindern.<sup>[156]</sup> Spots auf einer Oberfläche können sich durch die starken Spannungen daher leicht von der Oberfläche ablösen. Um dies zu verhindern werden aufwendige chemische Methoden zur Immobilisierung eingesetzt,<sup>[81, 101, 157-159]</sup> Dies verlängert andererseits den Produktionsprozeß.

Eine weitere Herausforderung bei der Hydrogel-Array-Herstellung ist der sogenannte „Donut“- oder „Kaffeerand-Effekt“.<sup>[160, 161]</sup> Ist die Prepolymerlösung auf die Oberfläche aufgebracht, resultiert das Trocknen derselben in einem radialen Strömen der Flüssigkeit zur Peripherie. Dieses Phänomen bedingt damit eine wachsende Inhomogenität der Spots. Jedoch ist für eine automatisierte Auslesung, wie es für Vor-Ort-Anwendungen angestrebt wird, die Spot-Morphologie und -Uniformität von entscheidender Wichtigkeit.<sup>[162, 163]</sup>

Wie oben beschrieben schließt die patientennahe Diagnostik die thermocyclische Amplifikation nicht aus. Daher gibt es auch vielerlei Bestrebungen diese mit einfacheren Detektionswerkzeugen zu verknüpfen. Beispielsweise wurde ein Mikroarray im Deckel eines PCR-Probengefäßes aufgebracht, so dass nach Vervielfältigung der DNS das Gefäß zur Hybridisierung auf den Deckel gedreht wird. So ist der gesamte Prozeß einschließlich des Ablesens des Ergebnisses mit Fluoreszenz-Mikroskopie ohne Öffnen des Gefäßes möglich.<sup>[164]</sup>

Eine andere neue Methode erlaubt durch im PCR-Gefäß angebundenes Polymer die Isolierung der DNS aus einer Lösung, ihre Amplifikation und Detektion in einem einzigen Probengefäß.<sup>[165]</sup> Ein ähnliches Vorgehen nutzten Manage et al. mit Hilfe von Hydrogel-Kassetten, die qPCR-Ingredienzien eingetrocknet enthalten und eine Isolierung von DNS aus Vollblutproben ermöglicht.<sup>[166, 167]</sup> Hier dient die poröse Hydrogel-Matrix als Filter zur Abtrennung der qPCR-störenden Blutbestandteile. Während der Amplifikation bindet ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff (zB. SYBR Green I) an das doppelsträngige PCR-Produkt. Die qPCR liefert somit zwar quantitativ wertvolle Ergebnisse in Echtzeit, jedoch birgt sie auch einige Nachteile gegenüber der konventionellen PCR. Zu diesen gehören die Kosten für das Equipment, denn eine qPCR-Apparatur ist 5-10 mal kostenintensiver als ein handelsüblicher PCR-Cycler. Ebenso preisintensiv sind die benötigten ready-to-use Mastermix-Lösungen, die für gewöhnlich fertig gekauft werden, wegen der Störanfälligkeit der qPCR auf geringste Abweichungen in der Zusammensetzung. Wegen ihrer hohen Sensitivität ist diese Methode auch sensitiver gegenüber kleinsten Fehlern und bedarf daher vieler Zwischenkontrollen.

Mit der Forschung der vorliegenden Arbeit soll den erwähnten Herausforderungen für Vor-Ort-DNS-Analysen begegnet und ein Beitrag zu deren Verbesserung geleistet werden. Dabei sollen Hydrogele zur Erweiterung der Sensor-Grenzfläche von einer 2D-Oberfläche zu einem 3D-Volumen zum Einsatz kommen. Dies beinhaltet die Suche nach einer Zeit-optimierten und Ressourcen-sparenden Herstellungsmethode der Hydrogel-dekorierten Chips. Diese soll eine hohe Uniformität der Spots und ihre feste Fixierung auf der Oberfläche ohne zusätzliche Prozeßschritte und Equipment ermöglichen.

Die enzymatische Silberabscheidung soll hier erstmalig mit den Vorteilen einer Volumenmatrix für die Hybridisierung kombiniert werden. Die Schwarzfärbung des DNS-Hydrogels kann mit bloßem Auge erkannt werden und bietet daher eine entscheidende Erleichterung der Auslesung für den Endnutzer. Dieses stabile Endpunktsignal ist auch nach Jahren noch unverändert. Die Funktionsfähigkeit der Meerrettich-Peroxidase wurde noch nie zuvor innerhalb eines Hydrogels getestet. Bestem Wissen nach konnte bisher auch noch keine Gesamtvolumen-Abscheidung von Silbernanopartikeln innerhalb eines Hydrogels zur Signalgebung erzeugt werden.

Weiter sollen möglichst viele Schritte des Detektionsprozesses von DNS-Isolierung, -Vervielfältigung bis –Detektion zusammengefasst und vereinfacht werden. Dies soll durch eine Integration der Hydrogel-dekorierten Chips in ein PCR-Probengefäß erreicht werden. Ziel ist die spezifische Detektion von pathogenen Keimen aus einer komplexen Matrix in weniger als 2 Stunden zu gewährleisten.

## **1.2. Eigene Forschungsergebnisse**

### **1.2.1. Zeit- und Ressourcen-sparende Ein-Schritt-Synthese für funktionsbereite**

#### **Hydrogel-Chips**

Hydrogele als hochporöse, in Wasser unlösliche Polymere schwellen aufgrund ihrer Hydrophilie in Wasser auf ein Vielfaches ihres Ausgangsvolumens. Zusammengesetzt sind sie meist aus 2 Grundbausteinen, dem Monomer mit einer funktionellen Einheit und dem Vernetzer mit zwei funktionellen Einheiten für eine Polymerisation. Allgemein kann der Vernetzungsgrad und damit die Porengröße durch die Konzentration dieser Bausteine variiert werden.

Für die angestrebte Verwendung als Interaktionsmatrix für Makromoleküle, müssen diese Gele sehr großporig gestaltet sein. Gele, die die Diffusion von Makromolekülen, wie DNS- und Proteinkomplexen erlauben sollen, benötigen eine maximale Porengröße, die nahe an der Grenze zu einer nicht vernetzenden Konzentration liegt. Die so gebildeten Gele sollen aber auch eine hinreichende Stabilität besitzen, um mehrere Spülschritte zu überstehen.

Die verschiedensten Moleküle und funktionellen Gruppen sind als Bausteine denkbar<sup>[140, 168]</sup> und ermöglichen eine Vernetzung unter anderem durch gerichtete chemische Reaktion,<sup>[169, 170]</sup> ungerichtete radikalische Kettenreaktion<sup>[81, 101, 143, 144]</sup> oder Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen<sup>[171]</sup>. Da eine schnelle und kostengünstige Bioanalytik angestrebt wird, ist die ungerichtete radikalische Kettenreaktion die Methode der Wahl. Sie ist schnell und lässt sich durch einfache Initiation via Erhitzen, chemische Reaktivität oder Belichtung je nach Art des Initiators bewerkstelligen. Ein Standard-Radikalbildner ist zum Beispiel Azobisisobutyronitril (AIBN), welches durch Erhitzen auf 65°C eine Reaktion initiiert<sup>[141, 143, 144, 172]</sup> oder Tetramethylethylenediamin (TEMED), welches chemisch die Radikalbildung von Ammoniumperoxodisulfat (APS) katalysiert.<sup>[87, 96]</sup> Vorherrschend in der DNS-Hydrogel-Herstellung kommen allerdings Photoinitiatoren zum Einsatz. Diese bieten die Möglichkeit der raschen Initiierung schon bei Raumtemperatur<sup>[173, 174]</sup> und der genauen Kontrolle von Zeit und Ort der Polymerisation<sup>[175-177]</sup>. Darunter finden sich unter den UV-angeregten Agentien Benzophenon (250 nm),<sup>[142-144]</sup> 2-Hydroxy-2-Methylpropiophenon (365 nm) und AIBN, weil es auch durch Lichteinwirkung der Wellenlänge von 260 nm Radikale bildet.<sup>[141, 178]</sup> Diese Varianten der Polymerisation bergen den gemeinsamen Nachteil des Bedarfs an zusätzlichem Equipment für die UV-Licht-Erzeugung. Sichtbares Licht dagegen erreicht eine größere Eindringtiefe und beschädigt biologische Proben sehr viel weniger als UV-Licht. Darüber

hinaus wurde die Schädigung der DNS durch UV-Licht nachgewiesen.<sup>[179, 180]</sup> Wegen seiner Fähigkeit zur Radikalbildung unter Bestrahlung mit sichtbarem Licht, fand der Farbstoff Eosin Y Anwendung in der DNS-Hydrogel-Produktion.<sup>[145, 146]</sup> Jedoch bleibt die Fluoreszenz bei einem solchen Photoinitiator des Typs II nach Polymerisation erhalten und beeinträchtigt damit die Auslesung von Fluoreszenz-markierter DNS. Denn die Extinktions- und Emissions-Spektren des Eosin Y überlappen mit vielen der gemeinhin genutzten Fluorophore. Zusätzlich ist für dessen ausreichende Radikalbildung ein Coinitiator beispielsweise Triethanolamin (TEOA) und ein Comonomer wie 1-Vinyl-2-Pyrrolidon (NVP) nötig.<sup>[181, 182]</sup> Ein alternativer wasserlöslicher VIS-Photoinitiator ist Lithiumphenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat.<sup>[183]</sup> Er wurde zuvor für die Einkapselung von lebenden Zellen in 3D-Polyethyleneglycol-Diacrylat (PEGDA) verwendet<sup>[184]</sup> und demzufolge als biologisch unschädlich identifiziert. Durch rheometrische Messungen konnten Fairbanks et al. für diesen Initiator eine zehnfach schnellere Gelierung einer PEGDA-Lösung mit Licht einer Wellenlänge von 365 nm verglichen mit Irgacure 2959 erreichen, einem bekannten UV-härtenden Verbundstoff. Darüber hinaus ist mittels des Phosphinates eine Polymerisation mit sehr geringen Initiatorkonzentrationen und Lichtintensitäten durchführbar.

Dieses Phosphinat wurde für die vorliegende Arbeit wegen seiner oben beschriebenen Vorzüge als Photoinitiator gewählt und konnte erfolgreich zur Vernetzung verschiedenster Polymergemische, Konzentrationen und Lichtintensitäten bestätigt werden [AB1]. Es stellte sich heraus, dass eine derart geringe Beleuchtung ausreicht, dass eine Polymerisation variabel im Feldeinsatz ohne zusätzliches Equipment bei Tageslicht oder mit Standardlaborbeleuchtung möglich ist. Als Modellmischung wurde dafür Rehman's Ansatz aus 70% Glycerin und 10% Acrylamid und Bisacrylamid (29:1) in Wasser gewählt. Schon 4% einer 1:200 verdünnten Initiator-Lösung führten zu einer stabilen Polymerisation der verschiedenen Mischungen. Außerdem wurde ein um 1900 Polyethylenglycol-Einheiten (PEG) verlängerter Bisacrylamid-Vernetzer eingesetzt, um die Porengröße der erzeugten Gele zu vergrößern. Als Monomer wurde zusätzlich N,N'-Dimethylacrylamid getestet, welches für seine schnelle Polymerisationsfähigkeit gute Bindung an Glas- und Metalloberflächen bekannt ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Hydrogele so direkt auf der Glasoberfläche immobilisiert werden können. Ein weiterer dafür unterstützender Fakt sind die Vorteile der Schwell-Stress-verminderten Ausdehnung der Gele bei Wasseraufnahme. Durch den geringen Dampfdruck des Glycerins trocknet die Monomermischung sehr langsam und der einleitend beschriebene „Kaffeerand-Effekt“ wird verhindert. Die Spots erhalten so eine gleichbleibende Form. Dabei dient das Glycerin als Abstandshalter zwischen den reagierenden Einheiten, welches beim

Waschen 1:1 durch Wasser ersetzt wird und daher kein Schwellen und damit auch keine Spannung des Netzwerkes auftritt. Die Viskosität der Monomerlösung bremst die Radikalreaktion nur in geringem Maße. Die Polymerisierung erfolgt innerhalb von 20 min und resultiert in fest immobilisierten Hydrogelen ohne vorherige chemische Aktivierung der Oberfläche.

Entscheidende Vorversuche beschäftigten sich mit der Variation der Glycerin-Menge, um das automatische Spotten der viskosen Prepolymerlösung mit einem Piezoelement zu gewährleisten. Bekannt waren für das Hydrogel-Drucken bisher nur Kontaktdruckverfahren, die durch Aufsetzen der Nadel auf eine unregelmäßige Polymerverteilung des Spots hinausliefen.<sup>[101, 142-144]</sup> Das Nicht-Kontakt-Drucken mit einem piezoelektrischen Nano-Plotter NP 2 (GeSiM, Grosserkmannsdorf, Germany) erlaubte die Formierung regelmäßiger konvexer Tropfen und ist möglich bis zu einer Konzentration von 60% Glycerin bei einem Gesamt-Acrylamid-Gehalt von 5%. Durch Spotten von Hand mit einer Pipette lagen die kleinsten erreichbaren Spotgrößen für einen Array zwischen 2 – 3 mm. Dagegen waren miniaturisierte Arrays durch automatisiertes Spotten mit Spotdurchmessern von ~0,5 - 1mm reproduzierbar zu erreichen. Es wurde eine Menge von 60 x 0,6 nl Tropfen gewählt, um einen gleichbleibenden Spotdurchmesser von  $710,3 \pm 83,8 \mu\text{m}$  zu erhalten.

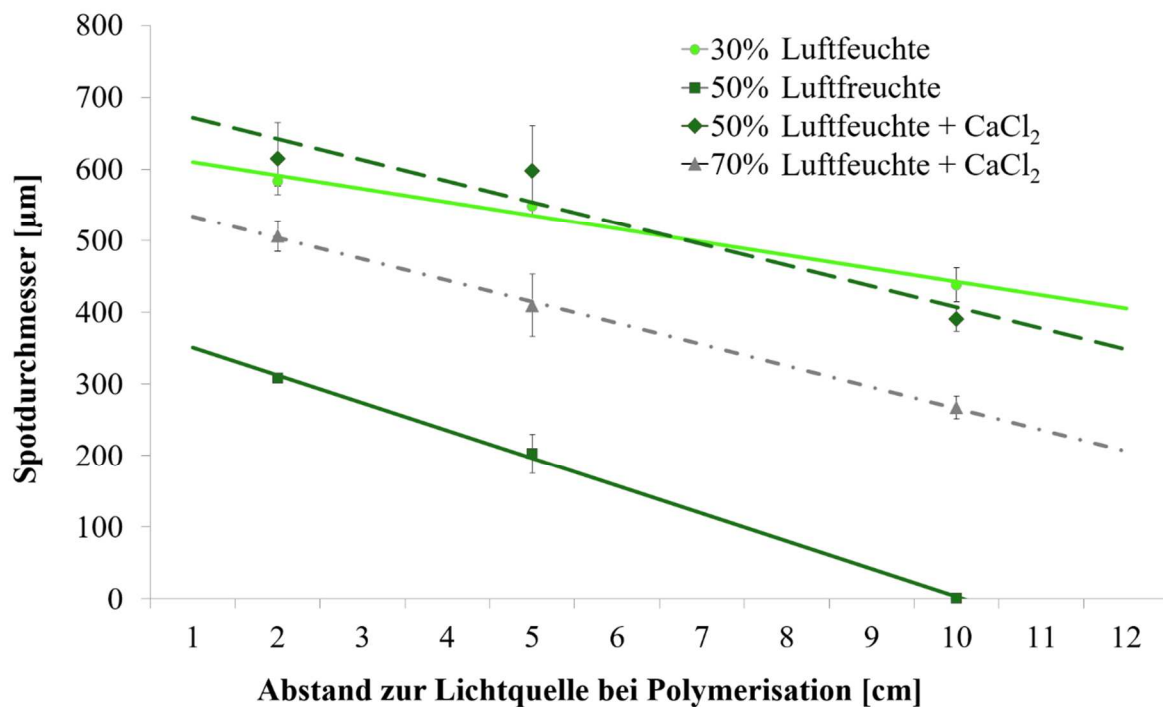
Ändert sich allerdings die umgebende Luftfeuchte stark, fällt der Einfluss des hygroskopischen Glycerins bei diesen kleinen Volumina stark ins Gewicht. Dieses zieht das Wasser aus der umgebenden Luft und verdünnt damit die Monommischung. Eine solche Konzentrations- und Volumen-Änderung während der Polymerisation verhindert die Vernetzung. Je höher die Luftfeuchte, desto tiefer dringt das Wasser von der Oberfläche in das Volumen der Spots vor und nur der unberührte Teil bleibt zur Vernetzung fähig. Daher erhält man bei höherer Luftfeuchte sehr viel kleinere Hydrogel-Volumina, als ursprünglich gespottet. Dieser Prozeß stört damit die Uniformität der Spotherstellung. Daher wurden Untersuchungen unternommen die Auswirkungen der Luftfeuchte zu kontrollieren.[AB1]

Dazu wurden verschiedene Parameter der Polymerisation variiert. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit wurde eine Standard-Leuchtstoffröhre (22W/T5) gleichbleibend für alle Experimente eingesetzt. Die Lichtintensität und Photoinitiator-Konzentration für eine Polymerisation wurden bei verschiedenen Luftfeuchtebedingungen variiert. Anschließend



wurde der mittlere Durchmesser der nach Spülen verbleibenden Spots gemessen und mit ihrem durchschnittlichen Originaldurchmesser direkt nach dem Spotten verglichen.

Das Experiment wurde bei unterschiedlichen Luftfeuchtebedingungen wiederholt und in der Grafik in Abbildung 3 zusammengetragen. Die zwei kontinuierlich dargestellten Linien zeigen die Ergebnisse für die abnehmenden Spotdurchmesser mit abnehmender Lichtintensität bei einer Luftfeuchte von 30% (hellgrün) und 50% (dunkelgrün). Schnell zu erkennen ist der große Einfluss einer solchen Änderung der Luftfeuchte um 20%.



**Abbildung 3:** Luftfeuchte Einfluss auf das Spot-Volumen und -Durchmesser Hydrogel-Spots.

Beginnend von einem Durchmesser von 700 µm nimmt er mit steigender Luftfeuchte und Abstand zur Lichtquelle ab und erreicht bei 70%/10 cm den Punkt der völligen Störung der Polymerisation.[AB1]

Mit Zunahme des Abstandes zur Lichtquelle nimmt der Durchmesser ebenfalls ab. Dies ist durch die verminderte Anregung des Photoinitiators durch die geringere Lichtintensität zu erklären. Bei einer Luftfeuchte von 50% und einem Abstand von 10 cm resultiert dies in einer völligen Verhinderung der Polymerisation und die Gelformation bleibt aus. Durch Anwendung von CaCl<sub>2</sub> zur Trocknung der umgebenden Luft lässt sich jedoch die Störung der Polymerisation verhindern. Die Ergebnisse unter Verwendung von CaCl<sub>2</sub> sind mit einer gestrichelten Linie zur Übersichtlichkeit verbunden. Bei 50% Luftfeuchte (dunkelgrün) sind somit durch Trocknung vergleichbare Ergebnisse wie bei einer Luftfeuchte von 30% erreichbar. Selbst bei einer Luftfeuchte von 70% (grau gepunktet) lässt sich durch die Anwendung dieser

Trocknungsmethode eine Polymerisation erreichen deren Effizienz der bei 50% weit übersteigt. Daher kann durch einfache Anwendung von  $\text{CaCl}_2$  der störende Einfluss der Luftfeuchte verhindert und eine Uniformität bei der Spotproduktion gewährleistet werden.

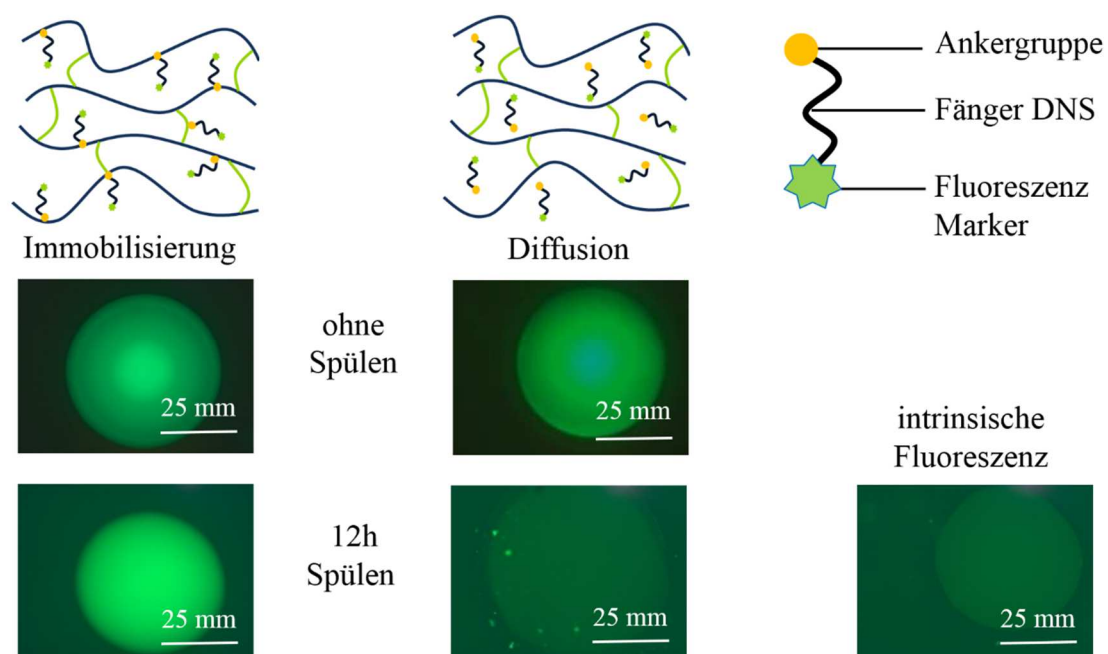
Der nächste entscheidende Schritt der Hydrogel-Erzeugung ist deren Funktionalisierung mit DNS. Im Kontext der 3D-Array-Forschung wurden dazu zahlreiche Strategien beschrieben. Unter anderen die Verwendung N-Hydroxysuccinimid,<sup>[146, 152]</sup> Epoxid<sup>[141]</sup> oder Bis-Succinimidyl-Suberat<sup>[185]</sup> funktionalisierter Polymer-Bausteine, die eine Anbindung von Amin-terminierter DNS ermöglichen. Da chemische Reaktionen in viskosen Medien aber langsamer ablaufen, ist besonders eine Anbindung in ein bereits polymerisiertes Gel gehindert. Folglich hielt im Rahmen der DNS-Hydrogel-Produktion die schon erwähnte radikalische Polymerisierung und damit Ein-Schritt-Synthese weiten Einzug.<sup>[83, 87, 89, 101, 142-145, 154, 182]</sup>

Eine Ein-Schritt-Synthese verkürzt und vereinfacht den Vorgang in erheblichem Maße und erübrigt zusätzliche zeitintensive Aktivierungs- und Reaktionsschritte. Die DNS-Moleküle binden hier zeitgleich mit der Formation des Gels an das Netzwerk.

Für erste Experimente wurde ein Oligonukleotid mit 15 zusätzlichen endständigen Thymin-Basen gewählt. Angestoßen wurde dies durch aktuelle Literatur, in der unmarkierte DNS über ein Polythymine-Ende zur Anbindung in ein Polymer genutzt wurde.<sup>[142-144]</sup> Thymin ist eine der vier Grundbausteine der DNS und kann unter UV-Bestrahlung (254 nm) selbst Radikale bilden, die dadurch direkt an jedes Kohlenstoffatom im Polymergerüst binden können. Die Nutzung von unmarkierten Oligonukleotiden birgt den Vorteil der Einsparung von Zeit und Kosten für eine chemische Funktionalisierung der Makromoleküle. Daher kam auch eine Poly-T-DNS zur Anbindung in die oben beschriebene Monomermischung zum Einsatz. Diese Vorgehensweise stellte sich jedoch für die Anwendung mit Silberabscheidung als unbrauchbar heraus, da nur oberflächengebundene und nicht volumengebundene Fänger-DNS für eine Hybridisierung zugänglich war. Die Schlussfolgerung liegt nahe, dass die mit 254 nm UV-Licht behandelte DNS innerhalb des Polymernetzes Quervernetzungen eingehen muss, die eine spätere Hybridisierung ausschließen und folglich nur Oberflächen-gebundene Moleküle für die Erzeugung des Signals dienen.

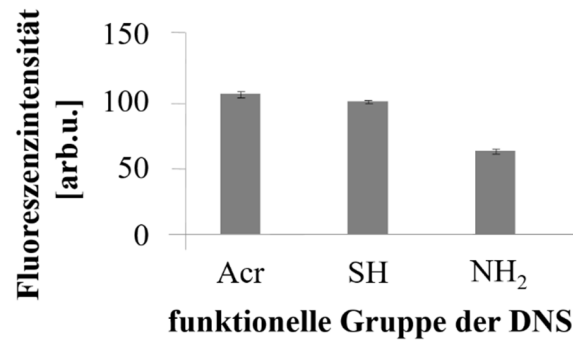
Es wurde daher in der vorliegenden Forschungsarbeit die Verknüpfung der Oligonukleotide mittels funktioneller Gruppen wie Acrydit (über endständige Phosphatgruppe gebundenes Methacrylamid) verfolgt.<sup>[186]</sup> Acrydit findet unter den verwendeten reaktiven Gruppen bevorzugt Anwendung in der aktuellen Literatur<sup>[81, 87-89, 96, 101, 149, 151, 187]</sup>, da es die Funktionalität

und Reaktivität der Gel bildenden Bausteine adaptiert und entgegen dem Acrylamid lagerstabil ist. Die Möglichkeit der Einbindung von Amin-DNS in Acrylamid-basierte Gele unter basischen Bedingungen entdeckten Rubina et al.<sup>[101]</sup> Inspiriert durch diesen Fund und die daneben wohlbekannte Thiol-En-Reaktion<sup>[170, 188, 189]</sup> wurde die Ein-Schritt-Synthese zusätzlich mit Amin- und Thiol-DNS durchgeführt. Zusammen mit der oben beschriebenen Photoinitiation über sichtbares Licht ist diese unkompliziert durchführbar. Der oben beschriebenen Mischung wurde die DNS-Lösung zugefügt ohne das Massenverhältnis von Monomer, Vernetzer, PI und Glycerin zu ändern. Dass das Gel nach Polymerisierung mit DNS funktionalisiert ist, konnte durch Verwendung von Fluorescein-markierter DNS (grün) bestätigt werden. (Abbildung 4) Diese wurde zum Vergleich in gleicher Konzentration mit DNS-freien Hydrogel-Spots inkubiert. Daher ist die Fluoreszenzintensität der resultierenden Hydrogele mit gebundener und diffundierter DNS gleich. Nach einem Spülgang ist die Gel-gebundene DNS durch die verbleibende Fluoreszenz erkennbar. Diese ist weit stärker als die intrinsische Fluoreszenz der Polymermatrix.



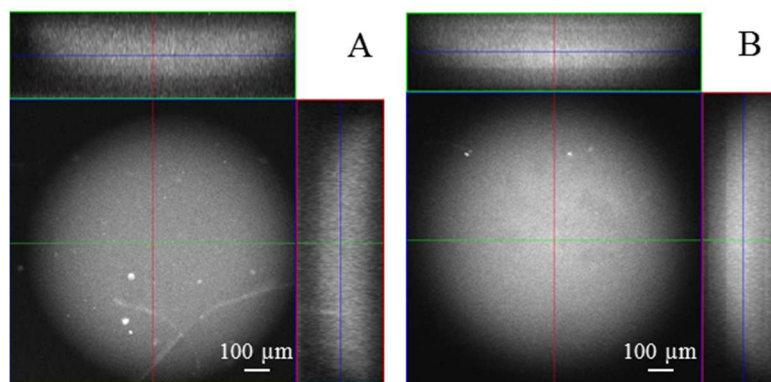
**Abbildung 4:** Vergleich der Fluoreszenz gewaschener Gele nach Einbindung oder Diffusion der DNS in die Hydrogel-Matrix. Nur die Gel-gebundene DNS verbleibt auch nach Spülen im Spot und ist anhand des Fluoreszenz-Markers nachweisbar.

Weiterhin wurde die Anbindungseffizienz der DNS mit drei verschiedenen Funktionalitäten getestet und eine abnehmende Einbindung von Adrydite über Thiol bis Amin in das Polymergerüst bei gleicher Oligo-Anfangskonzentration festgestellt (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Vergleich der Fluoreszenzintensität als Indikator der Anbindungseffizienz von DNS mit unterschiedlichen funktionellen Einheiten zur Einbindung in das Polymernetzwerk.

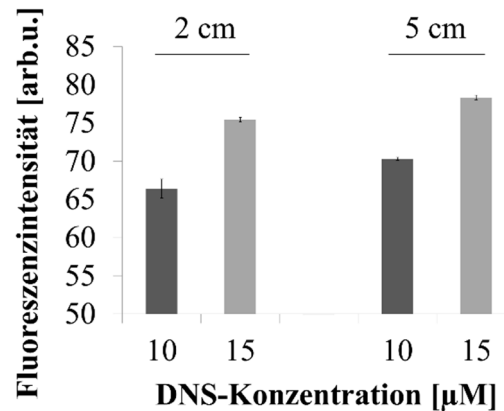
Der Nachweis für die gleichmäßige Verteilung der DNS sowohl nach Immobilisierung (A) als auch nach Hybridisierung (B) wird durch konfokale Bildgebung in Abbildung 6 veranschaulicht. Für den Nachweis der Fluoreszenz-markierten Ziel-DNS wurde zuvor unmarkierte Fänger-DNS in das Gel eingebracht.[AB2]



**Abbildung 6:** Vergleich der Fluoreszenz durch Polymer-Anbindung (A) oder Hybridisierung (B) eingebrachter DNS gleicher Konzentration. Die gleichmäßige Verteilung der DNS im gesamten Hydrogel-Volumen ist gegeben.[AB2]

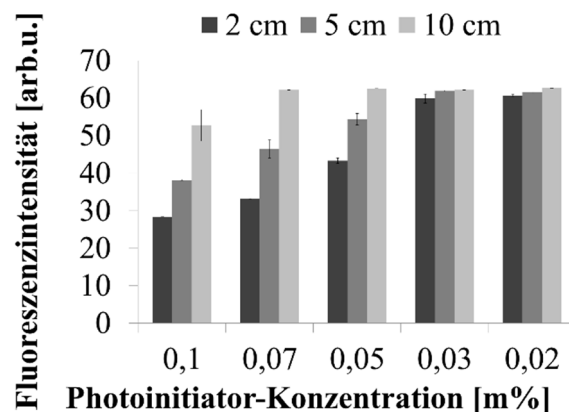
Des Weiteren wurden Untersuchungen zur Optimierung der DNS- und Photoinitiator-Konzentration vorgenommen, um die beste Leistungsfähigkeit der Hybridisierung zu gewährleisten. Denn die Konzentration der DNS und des Photoinitiators ist ausschlaggebend für die Menge an eingebundener Fänger-DNS und damit auch für die Stärke der Fluoreszenz des Signals. Deshalb wurden Versuche zur Untersuchung der Fluoreszenz bei unterschiedlicher DNS-Konzentration vorgenommen und in Abbildung 7 dargestellt. Es wurden drei unterschiedliche Konzentrationen gewählt, wobei 20 μM der Makromoleküle die Polymerisation auch bei höchster Lichtintensität verhindern. Eine Fänger-DNS-Konzentration

von 15  $\mu\text{M}$  stört die Polymerisation dagegen nicht mehr und liefert eine höhere Signalstärke als 10  $\mu\text{M}$ . Um daher eine maximale Signalstärke zu gewährleisten, empfiehlt sich die 15  $\mu\text{M}$  Fänger-DNS-Konzentration für die Monomermischung.[AB1]



**Abbildung 7:** Fluoreszenz der Ziel-DNS nach Hybridisierung mit Gel-gebundener Fänger-DNS unterschiedlicher Konzentration bei Vernetzung.[AB1]

Ebenso ist ein Einfluss der Entfernung zur Lichtquelle bei der Polymerisation festzustellen. Dieser fällt contra intuitiv aus. Bei einer geringeren Lichtintensität für die Polymerisierung wurde ein stärkeres Endsignal gefunden. Dies lässt sich durch die bevorzugte Reaktion kleinerer beweglicherer Einheiten in der Mischung gegenüber den Makromolekülen erklären. So läuft die Radikalreaktion bei höherer Lichtintensität schneller ab und begünstigt die Reaktion der Polymer-bildenden Einheiten. Der gleiche Trend ist deutlicher in Abbildung 8 zu erkennen. Hier wurde die PI-Konzentration bei gleichbleibender Fänger-DNS-Menge variiert und das Fluoreszenzsignal nach Hybridisierung mit markierter Ziel-DNS für unterschiedliche Entfernungen zur Lichtquelle während der Vernetzung aufgezeigt. Deutlich ist zu erkennen, dass dieser Effekt hohen PI-Konzentrationen sehr stark ist bei, für kleiner werdende Konzentrationen abnimmt und bei 0,03 m% verschwindet. So zeigt die Variation der Lichtintensität dort keine Auswirkung mehr auf die Endsignalstärke. Um also Immobilisierungsrate der DNS nicht negativ zu beeinflussen, ist eine PI-Konzentration von 0,03 m% empfehlenswert.[AB1]

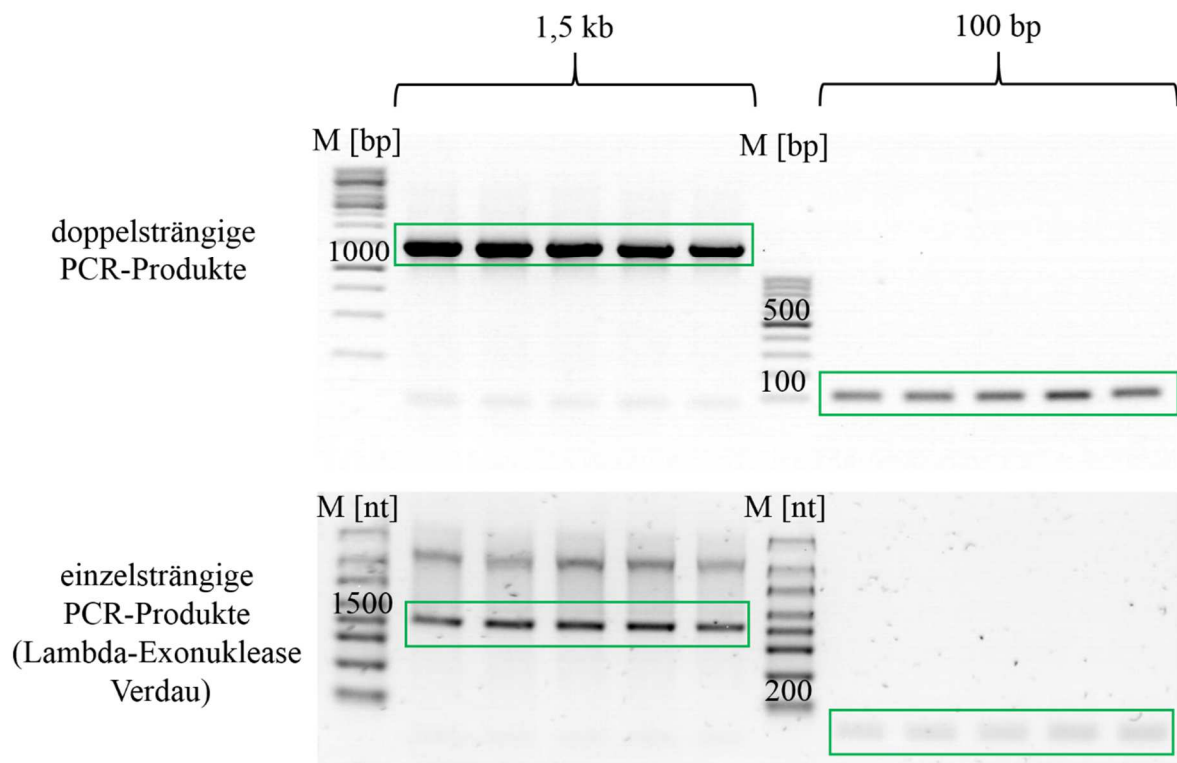


**Abbildung 8:** Vergleich der Fluoreszenz der Ziel-DNS bei unterschiedlicher PI-Konzentration für die Polymerisation.[AB1]

Zusammenfassend konnten in diesem Abschnitt weitreichende Erfolge bei der Hydrogel-Chip-Erzeugung aufgezeigt werden. Die Zeit- und Ressourcen-sparende Ein-Schritt-Synthese mit gleichzeitiger Anbindung der DNS ins Polymernetz konnte zweckvoll an ein automatisiertes Spotten im Nicht-Kontakt-Verfahren übertragen werden. Die Initiation erfolgt über sichtbares Licht und erübrigt so zusätzliches Equipment zur Erwärmung oder UV-Licht-Erzeugung. Dabei konnte selbst die Immobilisierung der Gele auf einer Glasoberfläche ohne vormalige chemische Aktivierung gewährleistet werden. N,N'-Dimethylacrylamid als Monomer ist dabei verantwortlich für die gute Bindung an Glas. Die weiteren Vorteile der Schwell-Stress-verminderten Ausdehnung der Glycerin-stabilisierten Vernetzung begünstigen darüber hinaus zusätzlich die Festigkeit der Spots auf der Oberfläche. Wichtig für die Förderung einer automatisierten, hochparallelen Auslesung ist die hohe Uniformität der so hergestellten Hydrogel-Arrays. Es konnte gezeigt werden, dass sich Störungen durch die umgebende Luftfeuchte leicht durch eine Trocknung mit  $\text{CaCl}_2$  ausgleichen lassen. Weiter konnte das Repertoire der funktionellen Gruppen zur Anbindung von DNS auf Thiol-Gruppen und Poly-T-Sequenzen für Acrylamid-basierte Gele erweitert werden. Die Leistungsfähigkeit der hier beschriebenen 3D-Chips konnte durch Optimierung der eingesetzten Reagenzien-Konzentrationen entscheidend verbessert werden. So wurde ein Glycerin-Gehalt von 60 % v/v, ein PI-Gehalt von 0,03 m% und eine DNS-Konzentration von 15  $\mu\text{M}$  als ideale Mischung für beste Signalergebnisse gefunden.

### 1.2.2. Parameteroptimierung für maximale Hybridisierungseffizienz

Erste Hybridisierungsexperimente für die oben beschriebenen Hydrogel-Arrays wurden mit einem *perfect-match*-System bestehend aus kurzen komplementären Fänger- und Ziel-Oligonukleotiden (30mer) gestartet. Für Forschungsinitiativen im Rahmen mobiler Analysesysteme ist darüber hinaus das Monitoring medizinisch relevanter Biomarker bzw. Pathogene von besonderem Interesse. Am Beispiel des Modellanalyten *E.coli* wurde so der biochemische Assay in weiterführenden Untersuchungen optimiert. Ausgangspunkt des chipbasierten Nachweises von *E. coli* war ein spezifisches Sonden- und Primerdesign. Hierfür wurde als bakterielle Ziel-Sequenz die 16S ribosomale DNS (16S rDNS) adressiert. Im Speziellen wurden zwei Fänger-Sequenzen gewählt (Ec1/Eco1, Ec4/Eco4), welche nach Immobilisierung auf der 2D-Chipoberfläche (Ec-Sonden) oder innerhalb einer 3D-Gel-Matrix (Eco-Sonden) mit verschiedenen Bereichen der 16S rDNS interagieren und somit einen Doppelstrang ausbilden. Eine Acrydit-Gruppe sorgt im Falle der Eco-Sonden für eine Einbindung in das Polymernetz. Ein zusätzlicher Poly-T-Linker erlaubt eine bessere Interaktion mit der Ziel-DNS durch einen gewissen Abstand der Fänger-Sequenzen zur Anbindungsmatrix. Im Falle der 2D-Oberflächenanbindung (Ec-Sonden), dient das Poly-T-Ende selbst (ohne Acrydit-Gruppe) als Linker zur UV-vermittelten Immobilisierung auf Glas. Ferner wurden mit Hilfe spezifischer Primer und der PCR zwei unterschiedlich lange PCR-Produkte der genomischen 16S rDNS von *E. coli* amplifiziert - ein 100 bp- und ein 1,5 kb-PCR-Fragment. Dabei ist die Fänger-Sonde Ec1/Eco1 komplementär zu dem 100 bp-PCR-Produkt und Ec4/Eco4 zu beiden PCR-Produkten. Ein erster Nachweis der erfolgreichen Amplifikationen erfolgte durch analytische Agarosegele (Abbildung 9). Zur Gewinnung einzelsträngiger PCR-Produkte als Ziel-DNS für die chipbasierte Hybridisierung wurde eine Lambda-Exonuklease-Spaltung angeschlossen. In Abbildung 9 sind die Banden der DNS nach erfolgter Gelelektrophorese in 5facher Wiederholung für beide PCR-Produkte grün markiert. Im Vergleich zu den Markerbanden ist die Menge der Basenpaare oder Nukleotide abzulesen.



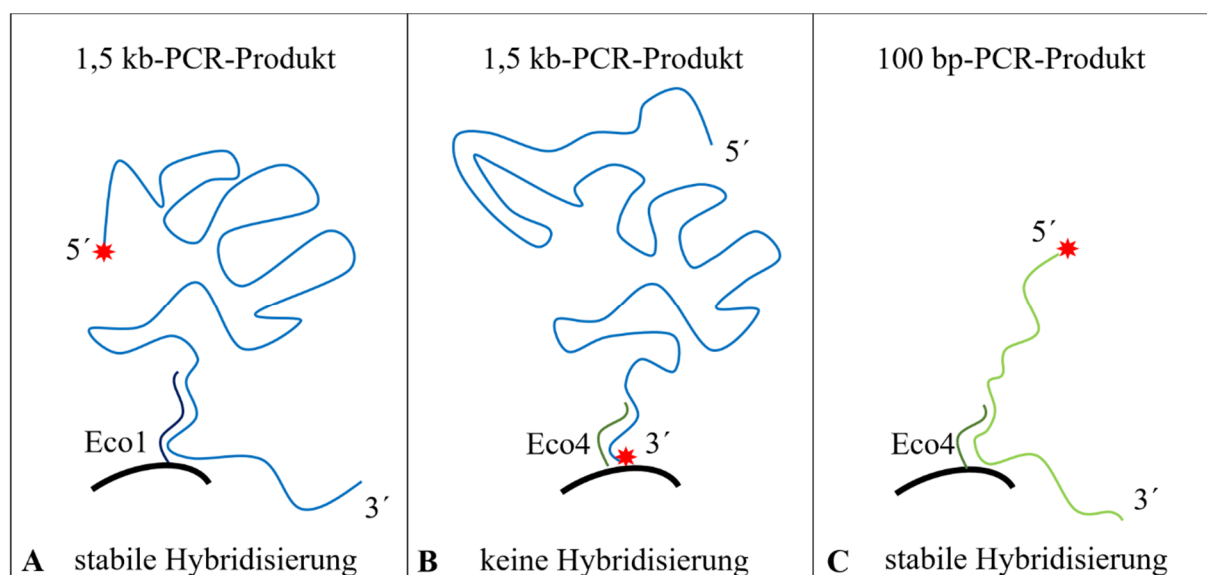
**Abbildung 9:** Analyse der PCR-Produkte & Generierung von ssDNS veranschaulicht durch Gelelektrophorese aufgespaltene Banden in Agarosegelen.

Da das 1,5 kb-PCR-Produkt die gesamte Region der 16S rDNS von *E. coli* umfasst und damit komplementäre Abschnitte zu beiden Fänger-Sequenzen (Ec1/Eco1 und Ec4/Eco4) enthält, könnte es prinzipiell an beide Sonden binden. Allerdings liegt die Sequenz der Sonde Ec1/Eco1 weitaus günstiger als Ec4/Eco4 für eine Hybridisierung. Die Fänger-Sequenzen sind über ihr 5'-Ende in dem Polymergerüst verankert und erlauben die Anlagerung der Doppelstrang-bildenden PCR-Produkte jeweils mit einem Überhang der Ziel-Sequenz an ihrem 5'- und 3'-Ende. Ersteres ist gegenüber der Flüssigphase und Letzteres gegenüber dem Polymergerüst exponiert.

Die Hybridisierung ist eine nicht kovalente Bindung über Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basen zweier Stränge. Die Stabilität der Hybridisierung und die Optimierung des Probedesigns unterliegen komplexen Faktoren und sind noch nicht ausreichend geklärt.<sup>[190, 191]</sup> So sind sich Forscher beispielsweise bis heute uneins über die stabilisierende Wirkung von 5'- und 3'-Überhängen. Einerseits zeigten die Ergebnisse der Untersuchungen, dass 5'-Überhänge ähnlich oder stärker stabilisierend sind als ihre 3'-Gegenstücke.<sup>[192]</sup> Andererseits wurde oft beschrieben, dass sich ein 5'-Überhang destabilisierend und ein 3'-Überhang stabilisierend verhält.<sup>[193, 194]</sup> Letzteres steht in Übereinstimmung mit den



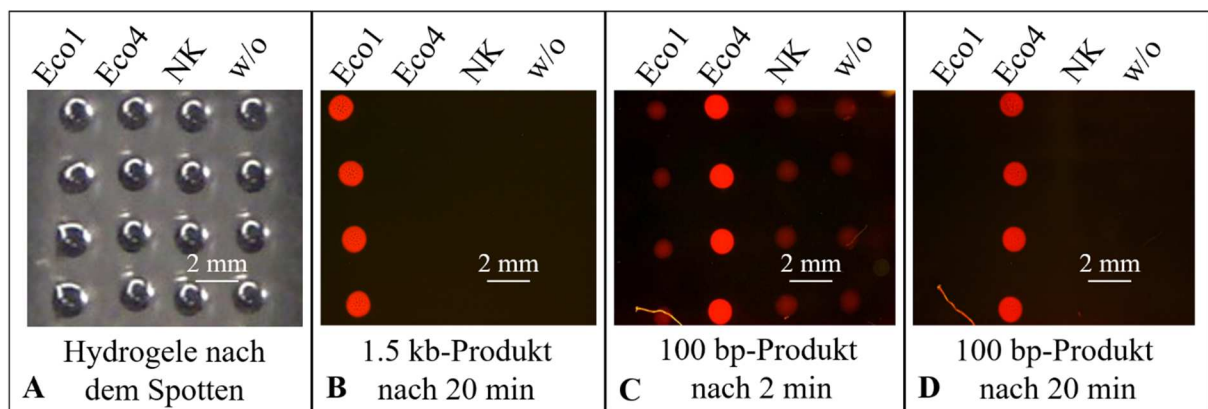
Ergebnissen in dieser Arbeit. Man nennt den Überhang der Sequenz über den Doppelstrang hinaus auch Sticky End (engl. für „klebriges Ende“) oder auch Klebeende. Über ein solches Klebeende in 5'-Richtung kann die Renaturierung der komplementären Sonden aus der umgebenden Lösung als Konkurrenzreaktion die Hybridisierungseffizienz stören bis hin zu einer völligen Verdrängung. Damit lassen sich die erzielten Resultate erklären. Denn obwohl das 1,5 kb-PCR-Produkt zu beiden Fänger-Sonden komplementär ist, ergibt sich nur eine Hybridisierung mit der Sonde Ec1/Eco1. So wirkt das kürzere 5'-Ende im Falle der Bindung an Ec1/Eco1 weniger destabilisierend als das lange 5'-Ende im Falle der Bindung an Ec4/Eco4 (siehe Abbildung 10A). Ein weiterer Befund besagt darüber hinaus, dass eine Hybridisierung mit Proben die nahe an einem Ende des PCR-Produktes positioniert sind (im Falle der Bindung an Ec/Eco4; Abbildung 10B) gehindert ist.<sup>[195]</sup> Darüber hinaus begünstigt die längere Ec1/Eco1-Fänger-Sequenz an Doppelstrang-bildenden Basenpaaren die Stabilität der Hybridisierung.<sup>[196]</sup>



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der Sonden-Position bei Hybridisierung mit dem langen und kurzen PCR-Produkt der *E. coli* 16S rDNS-Region. Das 1,5 kb-PCR-Produkt ergibt eine stabile Hybridisierung zu der Gel-gebundenen Sonde Eco1 (A). Aufgrund der ungünstigen Position der komplementären Sequenz direkt am markierten Ende der langen Sequenz ist die Hybridisierung mit Eco4 stark gehindert (B). Das nur zu Eco4 komplementäre 100 bp-PCR-Produkt hybridisiert dagegen stabil (C).

Das 100 bp-PCR-Produkt interagiert dagegen ausschließlich mit der Ec4/Eco4-Fänger-Sonde, da es nicht komplementär zu Ec1/Eco1 ist. Es bindet aufgrund der Übereinstimmung der Basen in intermediärer Position sehr stabil an die Fänger-Sequenz (Abbildung 10C).

Beide PCR-Produkte wurden in unabhängigen Ansätzen während der Amplifikation mit einem Fluorophor markiert. Nach einem anschließendem Lambda-Exonuklease-Verdau verblieb nur das gewünschte einzelsträngige markierte PCR-Produkt. Dieses wurde in ein 5xSSC-Puffersystem gegeben, auf die Hydrogel-dekorierten Chips aufgetragen und inkubiert. Danach folgte ein Waschvorgang für 20 Minuten. Die rote Fluoreszenz des genutzten Cyanin-Farbstoffes Cy3.5 verblieb spezifisch in den Gelen nach stabiler Hybridisierung, wie oben beschrieben (Abbildung 11B,D). Wie in Abbildung 11C zu sehen, ist schon nach 2 Minuten ein spezifisches Signal ablesbar und nach 20 Minuten Waschen ungebundene einzelsträngige DNS restlos entfernt.

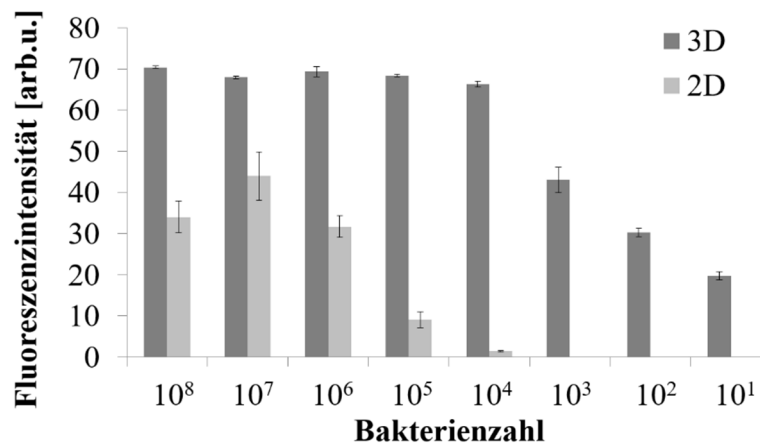


**Abbildung 11:** In Hydrogelen gebundene Fänger-Sonden hybridisieren spezifisch mit den komplementären Cy3.5-markierten 100 bp- und 1,5 kb-PCR-Produkten (Eco1; Eco4; NK = Negativkontrolle, nicht komplementäre Sequenz; w/o = ohne Fänger-DNS).[AB3]

Die Dauer der stabilen Hybridisierungsreaktion hängt neben dem Sondendesign auch von der Porengröße der Gele und der Länge der eingesetzten Sequenzen ab. Die Anbindung von Fänger-Sonden bis 100 Basenpaaren konnte mit der beschriebenen Prozedur innerhalb von einer Stunde erreicht werden. Makromoleküle einer Länge von 1,5 kb benötigen eine Hybridisierungszeit von 12 Stunden für eine vergleichbare Fluoreszenz-Signalstärke ([AB3] Abschnitt 2.7).

Die genomische DNS (gDNS) für die Vervielfältigung wurde aus den Bakterien mit einem Standard-Extraktions-Kit isoliert. Die Menge der dafür eingesetzten Bakterien wurde in einer Verdünnungsreihe bis auf  $10^1$  *E. coli* Bakterien verdünnt um die Funktionsfähigkeit des Nachweises auch bei kleineren Mengen an Ausgangsmaterial zu prüfen. Dafür wurde das amplifizierte PCR-Produkt mit dem Hybridisierungspuffer (5xSSC) auf 3D- und 2D-Chips inkubiert. In Abbildung 12 ist der Vergleich zwischen diesen beiden Varianten veranschaulicht. Die Detektion mit 3D-Hydrogelen ergibt deutlich stärkere Signale bis hin zu der kleinsten

Menge an eingesetzten Bakterien. Bei der Hybridisierung an 2D-gebundene Fänger-Sonden ist die verlässliche Detektion dagegen nur bis zu einer Zahl von  $10^5$  Bakterien möglich.

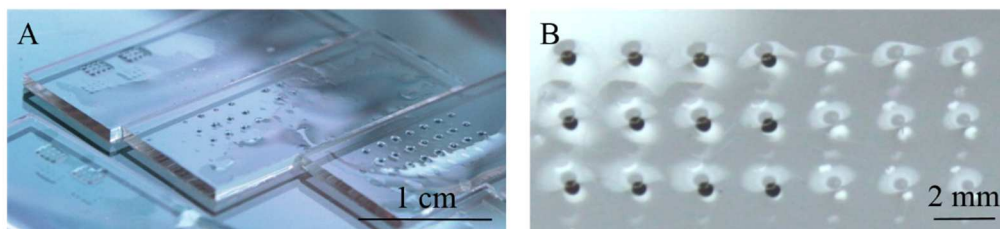


**Abbildung 12:** Fluoreszenzsignal des 100bp-PCR-Produktes nach Hybridisierung mit Gel-gebundener Fänger-DNS Eco4. Die Ausgangsmenge an DNS für die PCR wurde dafür aus einer unterschiedlich großen Zahl von Bakterien isoliert. Die Überlegenheit der Detektion mit 3D-Hydrogelen gegenüber 2D-Oberflächen ist deutlich sichtbar.

In diesem Abschnitt konnte zweckvoll die für Vor-Ort-Anwendungen nötigen Optimierungen der Hydrogel-DNS-Analyse am Beispiel des Modellanalyten *E. coli* gezeigt werden. Durch gezieltes Sondendesign und vergleichende Hybridisierungsexperimente konnten zwei passende Fängersequenzen identifiziert werden. Darüber hinaus konnte der Nachweis von aus *E. coli* isolierter gDNS über eine Fängersequenz innerhalb von nur 1:20 Stunden nachgewiesen werden. Ein Detektionslimit von bis zu 10 Bakterien konnte dabei erfolgreich bestätigt werden.

### 1.2.3. Einfache 3D-Hydrogel DNS-Detektion mit bloßem Auge

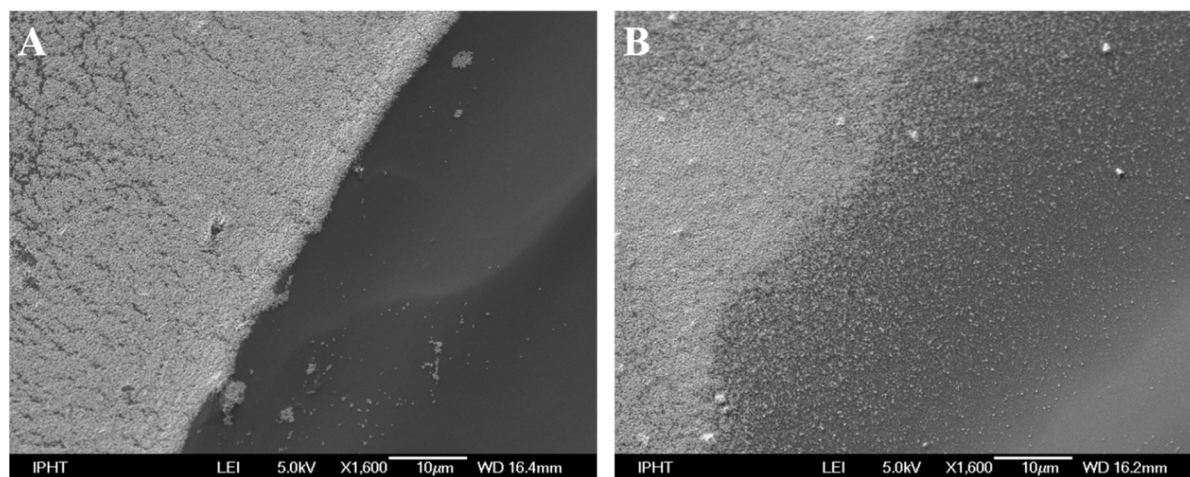
Es konnte erfolgreich die erste Methode zur kolorimetrischen mit bloßem Auge sichtbaren Detektion von DNS in Hydrogelen gezeigt werden. Dieses in [AB2] vorgestellte Verfahren vereint die Vorteile der robusten einfach handhabbaren Mikroarrays mit den Vorzügen der Oberflächen-vergrößerten Gesamtvolumen-Funktionalisierung eines 3D-Polymernetzes. In Abbildung 13A sind die Gele in verschiedenen Arraymustern und ihre Beständigkeit gegenüber Wasser erkennbar. Abbildung 13B zeigt die spezifische Silberabscheidung mithilfe des EnzMet Silber-Kits<sup>[129-132]</sup> nur in den Gelen mit erfolgter positiver Hybridisierung. Die Gele ohne DNS verbleiben durchsichtig.



**Abbildung 13:** Automatisiert gedruckte Hydrogel-Arrays in verschiedenen Layouts (A). Die schwarze Silberabscheidung dient zur einfachen visuellen Auslesung der erfolgten Hybridisierungsreaktion (B).

Viele moderne DNS-Detektmethode mit Hydrogelen beruhen auf Fluoreszenz-Untersuchungen.<sup>[81, 89, 96, 101, 143-145, 154]</sup> Für die Analyse ist dabei zusätzliche benötigtes Equipment und oft Erfahrung mit dessen Anwendung erforderlich. Mit bloßem Auge ablesbare Signale sind dagegen besonders für ungeschultes Personal sehr anwenderfreundlich. Metallische Nanopartikel wurden wie einleitend dargestellt zur optischen sowie elektrischen Detektion auf 2D-Oberflächen verwendet.<sup>[133-136]</sup> Für 3D-Hydrogele ist in der Literatur nach bestem Wissen nur ein Beispiel dafür bekannt. Baeissa et al. nutzten Goldnanopartikel-markierte DNS, um einen kolorimetrischen Nachweis der Rotfärbung über das Gold oder einer Schwarzfärbung durch eine reduktive Abscheidung von Silber an dem Gold zu erzeugen.<sup>[87]</sup> Diese Methode erschließt allerdings nicht das Volumen des erweiterten Mediums, da der Abscheidung nur an der Oberfläche der Gele zu beobachten war. Damit erschließt diese Methode auch nicht den Vorteil der höheren Beladung von Gelen gegenüber Oberflächen. Daneben erlauben die in diesem Falle verwendeten relativ großen frei schwimmenden Hydrogel-Pads nicht die miniaturisierte parallele Auslesung, wie zum Beispiel Chip-gebundene Arrays.

Die Bestrebungen der vorliegenden Dissertation lagen in der Übertragung der eingangs beschriebenen 2D-Methode der Silberpartikelerzeugung über das Redoxenzym Meerrettich-Peroxidase auf 3D-Hydrogele und der Erschließung ihres gesamten Volumens. In beginnenden Untersuchungen wurde der Enzymkomplex direkt zur Monomerlösung gemischt und während der Vernetzung innerhalb der Matrix eingeschlossen. Die Aktivität der HRP war nach Einbindung in das Polymergerüst unverändert. Daher lagen darauf folgende Bestrebungen in der Realisierung des Nachweises von Biotin-DNS innerhalb des Polymernetzes. Dazu kam in ersten Versuchen die wässrige Monomermischung einer Zusammensetzung von N,N'-Dimethylacrylamid (4,5% w/v), Bisacrylamid 0,05% w/v, Glycerin (60%, v/v), Biotin-DNS (15  $\mu$ M) und 0,03 m% PI zum Einsatz. Der Enzymkomplex wurde mit den Hydrogelen inkubiert und später die Silberabscheidung vorgenommen. Anschließend wurden die Gelkissen durch einen Skalpellschnitt in z-Richtung geöffnet und die Schnittfläche mikroskopisch auf das Vorhandensein von Silberpartikeln untersucht. Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen zeigten allerdings, dass das Silber nur an der Oberfläche des Gels auftrat (Abbildung 14A). Die metallischen Partikel erscheinen in der Aufnahme weiß und bedecken nur links im Bild die Oberfläche der Matrix. Die Schnittkante des Polymers rechts davon erscheint in dunkelgrau. Es ist eine klare Grenze zwischen der Silber-besiedelten Oberfläche und der darunter liegenden leeren Matrix zu erkennen.

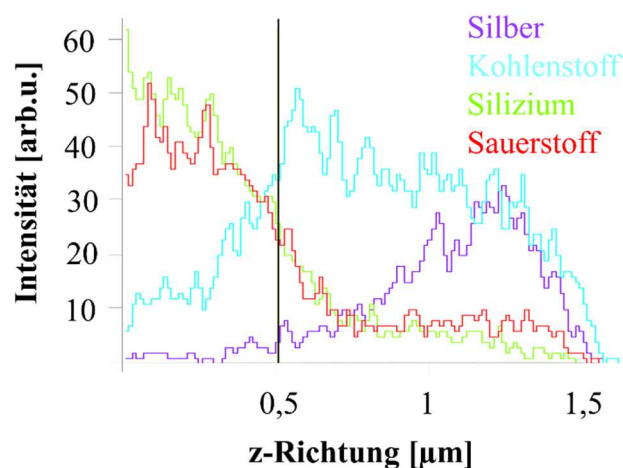


**Abbildung 14:** Oberflächenabscheidung der Silberpartikel bei Verwendung des kurzen Vernetzers Bisacrylamid (A) und Gesamtvolume-Abscheidung des Silbers bei Anwendung des Vernetzers PEG1900-Bisacrylamid (B).[AB2]

Nach Ersetzen des kurzen Bisacrylamid-Vernetzers durch den um 1900 Glycol-Einheiten längeren Vernetzer PEG1900-Bisacrylamid konnte das Silber auch im gesamten Volumen der Gele gefunden werden. In Abbildung 14B ist keine scharfe Grenze zwischen der Oberfläche

und der darunter liegenden Polymermatrix zu erkennen. Die Nanopartikel besiedeln das gesamte Volumen. Es ist zu schließen, dass die Porengröße der Hydrogele durch Verwendung eines langkettigen Vernetzers vergrößert und das Polymernetz dadurch für den Enzymkomplex durchlässig wurde und so eine Reduktion der Silberlösung im gesamten Volumen induziert.[AB2]

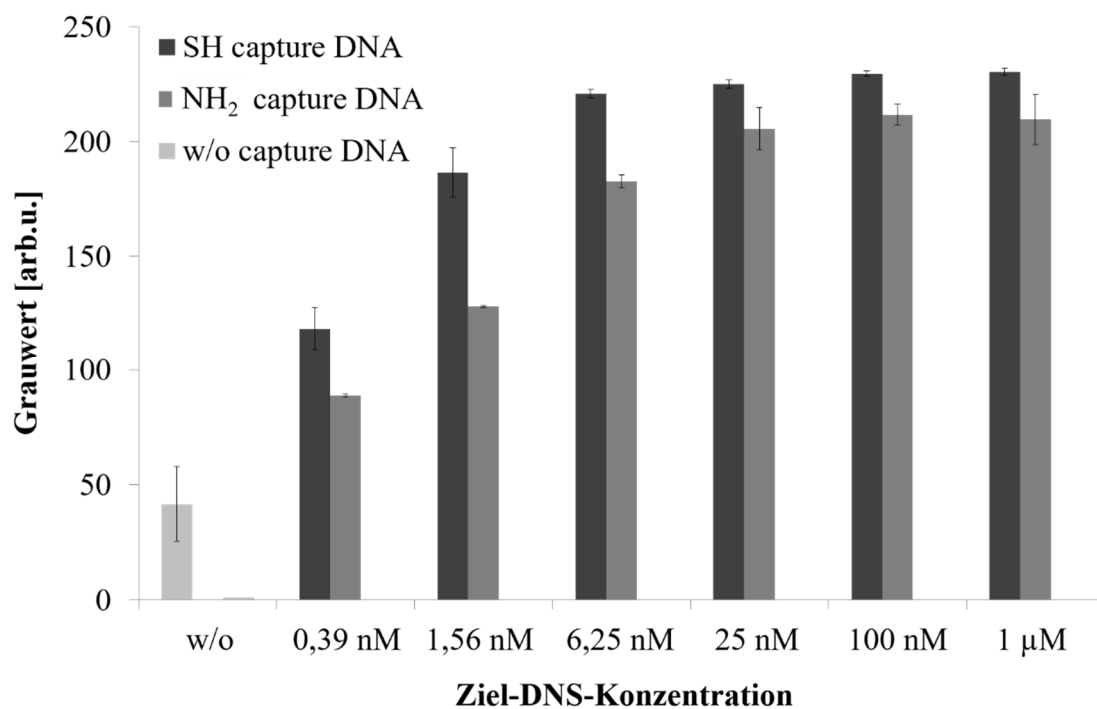
Um diese Beobachtungen weiter zu verifizieren, wurde eine Elementanalyse mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) angeschlossen. Zur Durchführung selbiger, wurden die Hydrogel-Chips nach Ablauf der Detektionsprozedur getrocknet und danach gefroren und gebrochen. Dieser sogenannte Kryobrush durch ein Silberhydrogel wurde anschließend durch EDX untersucht. Dabei beginnt die Analyse auf Glas und sammelt die Daten der Zusammensetzung in z-Richtung durch das Silber-durchzogene Polymer. Die Intensität der auftretenden Elemente ist für jeden Analysenpunkt in Abbildung 15 graphisch zusammen getragen. Hier kennzeichnet die senkrechte schwarze Linie bei 0,5  $\mu\text{m}$  kennzeichnet den Übergang von der Glas- in die Polymerphase. Bis 0,5  $\mu\text{m}$  sind Sauerstoff und Silizium die vorherrschenden Elemente des Glases. Über diese Grenze hinaus sinkt die Intensität dieser Elemente und der Kohlenstoff-Anteil steigt rapide an. Ebenso ist die zunehmende Menge an Silber bis zur Oberfläche des Polymers sichtbar.



**Abbildung 15:** EDX-Spektrum eines Kryobrushs der Hydrogel-Chips. In z-Richtung fortschreitend ist die Elementzusammensetzung im Glas bis 0,5  $\mu\text{m}$  und darüber hinaus im Polymer ablesbar. Im gesamten Polymer-Volumen sind Silberpartikel nachweisbar.[AB2]

Mit der so gefundenen Zusammensetzung der Monomermischung für eine ideale enzymatische Silber-Volumenabscheidung wurde nun die Funktionsfähigkeit der Chips nach erfolgter Hybridisierung auf Grundlage des oben beschriebenen synthetischen DNS-Systems geprüft.

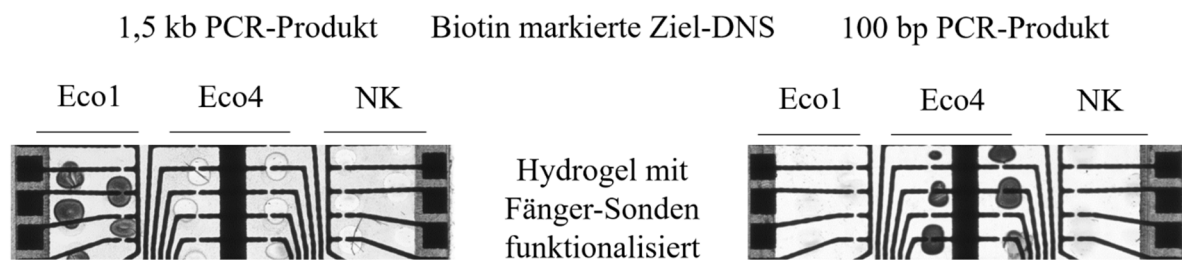
Die Fänger-DNS wurde dafür über unterschiedliche Funktionalitäten in das Polymernetz gebunden. Da die Bindung mittels Thiol-Gruppen nur geringfügig schwächer ist als mit Acrydite und ein Novum in der Synthese mit Acrylamid-Gelen darstellt, wurden die Untersuchungen auf SH- und NH<sub>2</sub>-funktionalisierte Fänger-DNS beschränkt. Als Ziel-DNS dienten Biotin-markierte synthetische Sequenzen in unterschiedlicher Konzentration. Das Signal der schwarzen Silberpartikel wurde durch Grauwertanalyse ausgewertet und in Abbildung 16 vergleichend aufgetragen.[AB2] Bis 6,25 nM an SH-Ziel-DNS-Konzentration ist ein Anstieg des Grauwertes zu verzeichnen, der dann in einem Plateau ab einer Konzentration von 6,25 nM resultiert. Dies könnte ein Indikator für die hervorragende Zugänglichkeit der Gele für eine Hybridisierungsreaktion sein, dass jeweils alle Anbindungsstellen auch innerhalb eines weiten Bereichs der Konzentrationsänderung besetzt werden können.



**Abbildung 16:** Beispiel-Chip für den Prototyp der visuellen Auslesung der Hybridisierungsreaktion von 1 nM Ziel-DNS. Die Signale der N150-Fänger-DNS sind gegenüber der Negativkontrolle (NK) nicht mehr zu unterscheiden.[AB2]

Es lässt sich eine unterschiedliche Immobilisierungseffizienz für die verschiedenen funktionalisierten Oligonukleotide ableiten. Hydrogel-Strukturen mit Thiol-Fänger-Sonden weisen die stärkste Schwarzfärbung auf. Dies beruht auf der erhöhten Nukleophilie der funktionellen Gruppe SH bei der Reaktion mit Acrylamid-Einheiten gegenüber NH<sub>2</sub>, was in einer höheren Beladung der Gele mit Fänger-DNS im Falle der Thiol-Gruppe resultiert und damit auch in einer erhöhten Anbindung an signalgebender Ziel-DNS. Die Thiol-Einheiten

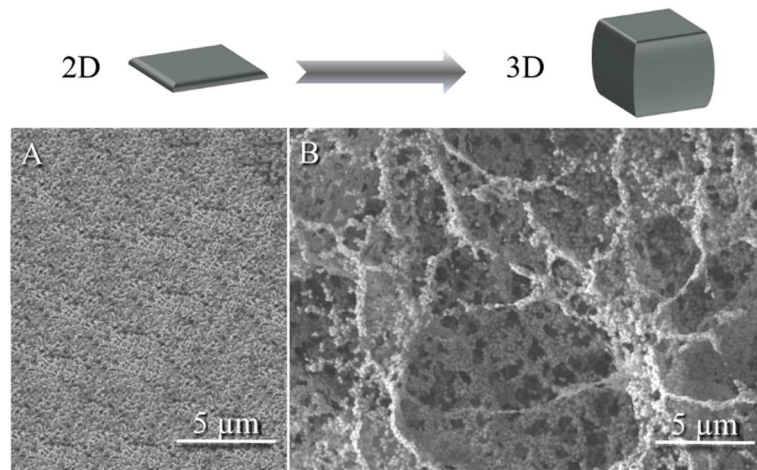
binden über die Thiol-En-Reaktion durch den Mechanismus der freien Radikal-Addition oder der Michael-Addition in das Polymernetz. Die Amin-Einheiten dagegen binden über eine nukleophile Addition (Michael-Addition). Erfolgreich konnte die prinzipielle Durchführung für die visuelle Detektion mit bloßem Auge bewiesen und eine Nachweisgrenze bis 390 pM Ziel-DNS des Prototyp-Chips ohne zusätzliche Hilfsmittel oder Nachverstärkung erreicht werden.[AB2] Zusätzlich gelang die spezifische Hybridisierung auch für das bakterielle DNS-Modellsystem für *E. coli* im 3D-Volumen mittels enzymatischer Silberabscheidung (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Spezifische Hybridisierung Biotin-markierter PCR-Produkte an Gel gebundene Fänger-Sonden. Das lange 1,5 kb-PCR-Produkt bindet an die Sequenz-komplementäre Sonde Eco1 (links) und das kurze 100 bp-PCR-Produkt bindet an die Sonde Eco4 (rechts).

In diesem Kapitel wurde die generelle Durchführbarkeit der Silberabscheidung mit Meerrettich-Peroxidase innerhalb eines 3D-Mediums vorgestellt. Erstmals gelang es das Volumen von Hydrogelen für eine kolorimetrische Nanopartikel-Abscheidung zugänglich zu machen.[AB2] Dabei liegt der entscheidende Vorteil in der enormen Vergrößerung der Detektions-Grenzfläche von 2D auf 3D, wie in Abbildung 18 schematisch und durch REM-Aufnahmen veranschaulicht. Dieser grundlegenden Erkenntnisse könnten daher entscheidende Weiterentwicklungen für bestehende Sensorsysteme erbringen.

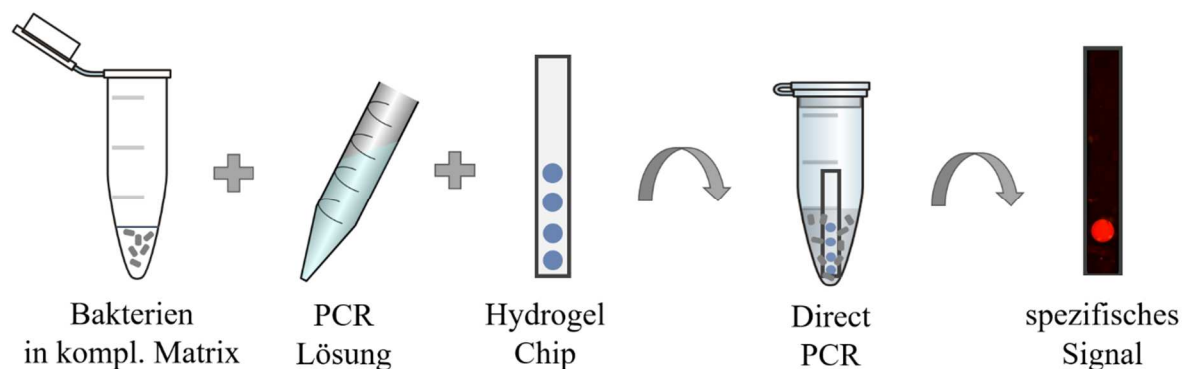




**Abbildung 18:** Silberabscheidung auf einer 2D-Oberfläche (A) und im Volumen der Hydrogele (gefriergetrocknet) (B).

#### 1.2.4. Vor-Ort *E. coli* Detektion aus einer komplexen Matrix durch kombinierte direkte Hydrogel-PCR

In Vor-Ort-Situationen sind Zeit und Handhabbarkeit entscheidende Faktoren für die DNS-Detektion. In der vorliegenden Arbeit wurde eine zeitsparende Hydrogel-PCR-Methode entwickelt, die gänzlich neue Möglichkeiten für die DNS-Analyse erschließt. Ein neues „all-in-one“-Konzept wurde erstellt, das die langwierige Prozeßkette der Pathogenidentifikation zu einem Schritt verkürzt (siehe Abbildung 19). In dem vorgestellten Prinzip können Bakterien direkt aus einer komplexen Matrix nach einer kombinierten PCR nachgewiesen werden. Allein durch Zugabe der PCR-Lösung und des Hydrogel-Chips wird das Auslesesignal während der Amplifikation akkumuliert.[AB3]



**Abbildung 19:** Verkürzung der Prozeßreihe der Probenvorbereitung, Amplifikation und Hybridisierung zu einem Schritt: symmetrische Direkt-PCR.

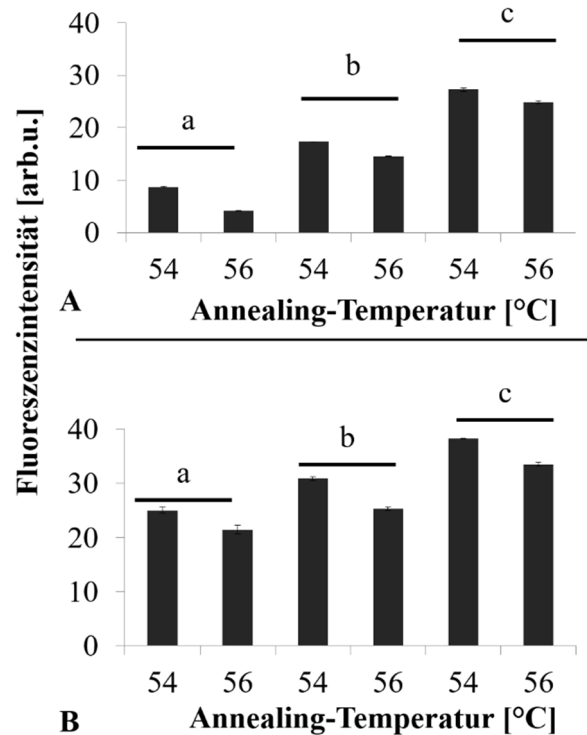
Bislang benötigen Standardprozeduren mehrere Schritte der Bakterien-Isolierung, Bakterien-Lyse, Extraktion der gDNS, Anpassung des Puffers für die beste Arbeitsleistung der Polymerase zur Vervielfältigung, danach die PCR und nach erneuter Anpassung des Puffers für eine gute Hybridisierungsreaktion erfolgt diese durch eine anschließende Inkubation. Somit sind viele Arbeits- und Pipettier-Schritte vonnöten. Erstrebenswerter für Vor-Ort-Situationen wäre allerdings ein komprimierterer Ablauf.

Weiter ist für die chipbasierte DNS-Analyse eine vorherige Nukleinsäure-Amplifikation durch eine PCR ein noch unumgänglicher Schritt. Einleitend wurden verschiedene Wege der Integration der PCR im POCT aufgezeigt. Mit diesem Prozeßschritt und der langwierigen Hybridisierung werden derzeit 0,5-2 zusätzliche Stunden Zeitumfang der gesamten Detektionskette hierdurch beansprucht. Eine denkbare Möglichkeit zur Einsparung dieser Zeit wäre der direkte RNS-Nachweis der Bakterien in einem Sandwich-Hybridisierungs-Assay. Die

Erreger-RNS könnte durch einen Direktnachweis ohne vorherige Amplifikation für die on-Chip-Hybridisierung verwendet werden. Damit könnte der Amplifikationsschritt eliminiert und der Nachweis beschleunigt werden. Allerdings ist RNS ein höchst instabiles Molekül, dessen Reinheitsanforderungen in Vor-Ort-Situationen schwer erfüllbar sind.

Eine weitere Möglichkeit der Zeitersparnis ist die Zusammenfassung von DNS-Vervielfältigung und chipbasierter Hybridisierung. Dies gelang mit der Integration der 3D-Chips in ein PCR-Reaktionsgefäß. Das Hybridisierungsergebnis kann dabei direkt nach Ablauf der PCR während des Waschens der Chips fluoreszenzbasiert detektiert werden. Ausgangspunkt dieses „all-in-one“-Konzeptes war die Miniaturisierung der 3D-Arrays, welche in dieser Form dem PCR-Ansatz direkt zugesetzt werden konnten (Abbildung 19). Die Hydrogel-Chips überstehen dabei die wiederholten extremen Temperatursprünge von 95, 73 und 54°C ohne Ablösen der Gele und ohne die Vervielfältigung der DNS zu hindern [AB2].

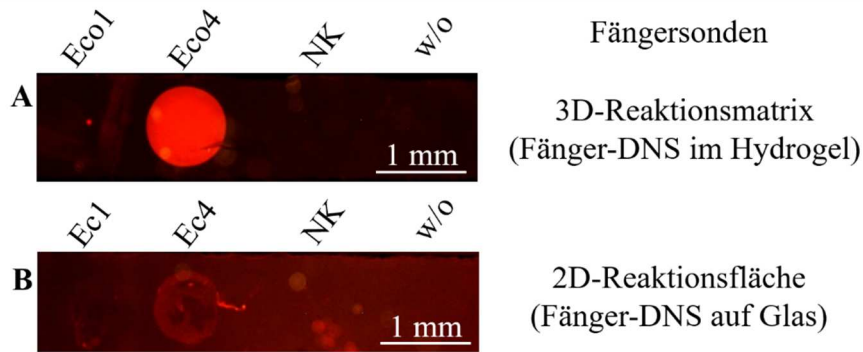
Für beginnende Untersuchungen war die Erarbeitung einer asymmetrischen PCR naheliegend, um einzelsträngige DNS-Amplifikate *in situ* für die Hybridisierung mit den Fänger-Sonden zu erzeugen. Damit ein zusätzlicher Schritt zur Einzelstrang-Erzeugung eingespart werden kann. Zur ersten Testung der Durchführbarkeit wurden die miniaturisierten 3D-Chips in einen PCR-Ansatz zur Amplifikation von isolierter gDNS gegeben. Es wurden so verschiedene molare Verhältnisse von „Forward“- und „Reverse“-Primer getestet, um die günstige Primerkombination von 1:10 zu ermitteln. Die Ergebnisse zeigten weiter, dass eine Steigerung der eingesetzten gDNS-Menge und eine Annealing-Temperatur von 54°C (gegenüber 56°C) bessere Signale erzielen (Abbildung 19A). Im Vergleich dazu wurden vergleichende Experimente mit einer symmetrischen PCR durchgeführt (Abbildung 19B). Obwohl diese Methode doppelsträngiges Produkt erzeugt, konnten auf diesem Wege sogar bessere Ergebnisse erzielt werden als mit einer asymmetrischen PCR. Denn nach dem Aufbrauchen des limitierenden Primers wächst bei dieser die Produkt-Menge nicht mehr exponentiell, sondern linear. Der Schluß liegt nahe, dass die Zeit zwischen Denaturierung und Annealing der wiederholenden Zyklen auch die Anlagerung an die Gel-gebundenen Fänger-Sonden erlaubt und möglicherweise durch Entzug des Reaktionsproduktes die PCR noch beschleunigt. Da das Detektionssignal hier sogar höher ist, kann von der Anwendung einer asymmetrischen Methode abgesehen werden.



**Abbildung 19:** Fluoreszenzintensität eines in die PCR integrierten Hydrogel-Chips mit Änderung der Anlagerungs-Temperatur und gDNS Konzentration (a = 4, b = 12, c = 24 ng) für eine asymmetrische (A) und symmetrische PCR.[AB3]

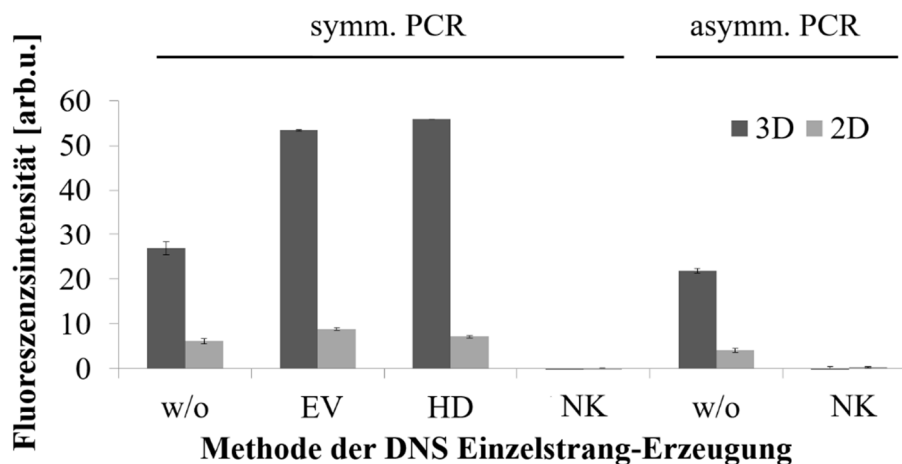
Parallel dazu wurden vergleichende Versuche mit integrierten 2D-Chips ausgeführt. Hier ist die DNS direkt auf der Glasoberfläche gebunden. Selbige ergaben sehr viel geringere Fluoreszenzsignale bei gleicher Belichtungszeit (10 Sekunden) als die 3D-Replika. In Abbildung 20 ist die spezifische Hybridisierung des 100 bp-PCR-Produktes (rot markiert mit Cy3.5) an die Eco4/Ec4 Fänger-Sonden zu entnehmen. Daher führt die kombinierte Chip-PCR zu keiner unspezifischen Biomolekül-Bindung an die Hydrogel-Matrix oder nicht-komplementäre Sonden.

Der Hydrogel-Spot (A) erscheint sehr viel stärker in seiner Fluoreszenzintensität. Der 2D-Spot (B) dagegen erscheint sehr schwach. Diese Überlegenheit der 3D-Hybridisierung ist durch die räumliche Anreicherung der einzelsträngigen Ziel-DNS innerhalb des Polymernetzes zu erklären. Die Diffusion ist innerhalb des Polymermediums leicht verzögert und verhindert das Auseinanderdriften der DNS-Interaktionspartner nach thermischer Denaturierung (zyklische Folge während der PCR).[AB3] Zusätzlich ist die Spotmorphologie des 3D-Spots sehr viel ebenmäßiger als die des 2D-Spots, was zuträglich für eine automatisierte Auslesung ist.



**Abbildung 20:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Vergleich der Fluoreszenzsignale zwischen 3D-Gel und 2D-Oberfläche nach einer PCR mit integriertem Auslese-Chip.

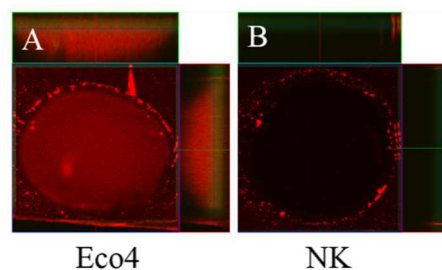
Anschließend wurden gegenüberstellend verschiedene PCR-Methoden auch mit nachfolgender Einzelstrang-Erzeugung auf ihre Signalintensität mit 3D- und 2D-Chips geprüft. Abbildung 21 veranschaulicht die generelle Überlegenheit der 3D-Hybridisierung gegenüber 2D. Ausserdem sind die Signale der symmetrischen PCR gegenüber der asymmetrischen stärker. Diese konnten durch einen anschließenden Schritt der Einzelstrang-Erzeugung durch Lambda-Exonuklease-Verdau (EV) oder Hitzedenaturierung (HD) nochmals um das Doppelte gesteigert werden.



**Abbildung 21:** Fluoreszenzintensität im Vergleich für verschiedene Methoden der Einzelstrang-Erzeugung bei einer PCR mit integriertem 3D- und 2D-Chip.

Die Hitzedenaturierung ist ein passendes Vorgehen, um die Signalstärke für die kombinierte Chip-PCR zu verstärken. Sie benötigt weder eine Öffnung des Reaktionsgefäßes noch zusätzliche Handhabung wie der Lambda-Exonuklease-Verdau. Der erforderliche 95°C-Hitzeschritt kann auf einfache Weise in das Programm der PCR eingegliedert werden.

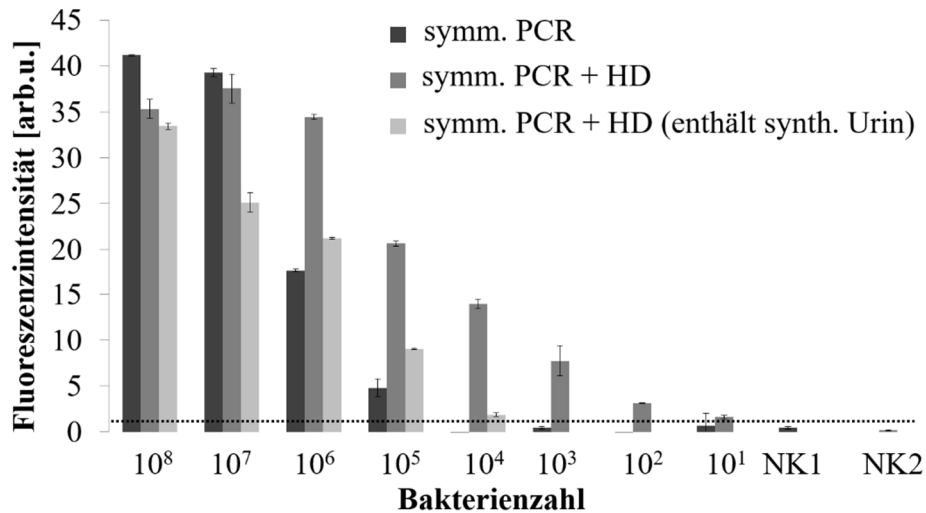
Darüber hinaus wurde das komprimierte Verfahren schrittweise auf zusätzliche Vereinfachungen getestet. Daher wurden in nächsten Versuchen lysierte Bakterien statt isolierter gDNS eingesetzt, um den Einfluss der verbleibenden Zellbestandteile auf die Vervielfältigungsreaktion zu testen. Bei der Lyse werden die Bakterien unter 95°C Erhitzen zur Perturbation gebracht und die im Zellkern enthaltene gDNS freigesetzt. Nach Zusatz dieser Gesamtlösung zur PCR waren keine negativen Effekte zu beobachten. Deshalb wurden in darauffolgenden Versuchen die Bakterien direkt zum PCR-Ansatz gegeben. Hier diente der erste Heizschritt der PCR zur Lyse der Bakterien um weiter Zeit und Hantierschritte einzusparen. In Abbildung 22 sind die Aufnahmen eines konfokalen Mikroskops für die erfolgte Hybridisierung nach kombinierter Direkt-Chip-PCR (A) und ihre Negativkontrolle (B) abgebildet. Die Hydrogele fungieren zusätzlich als eine Art Porenfilter, der störende Zellreste abschirmt. Die Zellbestandteile verbleiben sichtbar aussen um die Gele und dringen nicht in die Matrix ein. Die Fluoreszenz ist spezifisch ausschließlich in dem Gel mit Fänger-DNS zu finden.



**Abbildung 22:** Direkt-PCR mit reinem Zelllysate ( $10^8$  Bakterien). Deutlich sichtbar sind die Zellbestandteile, die sich aussen am Hydrogel bei erfolgter Hybridisierung (A) oder ohne diese (B) anlagern.

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit für reale Probenmatrizes wurden die Bakterien unmittelbar aus einer komplexen Matrix eingesetzt. Dazu wurden die Bakterien in synthetischem Urin über Nacht inkubiert und zusammen mit diesem Medium in den Chip-PCR-Ansatz gegeben. Es ist als Erfolg zu verzeichnen, dass diese „all-in-one“-Methode ebenso zu Ergebnissen führte und die zusätzlichen Salze nicht die Hemmung der Polymerase Reaktion verursachten. In Abbildung 23 sind die Fluoreszenzsignale der erfolgten spezifischen Hybridisierung des 100 bp PCR-Produktes in verschiedenen symmetrischen PCR-Ansätzen zusammengetragen. Dabei erzielte die PCR mit nachfolgender Hitzedenaturierung die besten Fluoreszenzsignale gefolgt von den Ergebnissen mit zusätzlich enthaltenem synthetischem Urin.[AB3] Das PCR-Zyklus-Profil ermöglicht die Amplifikation innerhalb einer Stunde, sprich initiale Lyse bei 95°C für 10 min, 30 Zyklen der Denaturierung bei 95°C für 30 sec,

Annealing bei 54°C (100 bp Fragment) für 30 sec, Elongation bei 72°C für 30 sec (100 bp Fragment) und einer finalen Elongation bei 72°C für 5 min. Selbst mit einer zusätzlichen Hitzedenaturierung und Inkubation ist die gesamte Prozeßkette innerhalb von 1:30 Stunden durchführbar.



**Abbildung 23:** Fluoreszenzintensität nach kombinierter Direkt-Chip-PCR mit direkt eingesetzten Bakterien im Gesamtansatz. Drei Möglichkeiten sind dargestellt: eine einfache symmetrische PCR, die die Detektion bislang bis 10<sup>5</sup> Bakterien erlaubt, eine symmetrische PCR mit Hitzedenaturierung, die eine Detektion aktuell bis zu 10 Bakterien erlaubt und eine symmetrische PCR mit Hitzedenaturierung direkt aus synthetischem Urin, die bisher bis 10<sup>4</sup> Bakterien erfolgreich ist. Zur Spezifitätskontrolle wurden eine PCR ohne Template (NK1) und eine PCR mit Zusatz von *Bacillus subtilis* (10<sup>8</sup> Bakterien) durchgeführt. [AB3]

In diesem Abschnitt konnte ein nach jetzigem Stand rapider, leicht durchführbarer und Kosteneffizienter Assay für eine *E. coli*-Detektion präsentiert werden. Die zuverlässige Leistungsfähigkeit der neuartigen Direkt-Chip-PCR mit in-Gel-Hybridisierung während der Amplifikation konnte nachgewiesen werden.[AB3] Dabei akkumulieren die Gel-gebundenen Fänger-Sonden schon während den wiederholten Heiz-Kühl-Zyklen einer symmetrischen PCR Ziel-DNS und damit spezifische Fluoreszenzsignale. Damit ergibt sich eine enorme Zeitersparnis die zuvor für Isolierung, PCR und Hybridisierung der DNS erforderlich war. Das Konzept erlaubt so eine einfache „all-in-one“-PCR ohne zusätzliche Pipettier- und Inkubationsschritte innerhalb von nur 1:30 Stunden. Damit repräsentiert die vorliegende Studie einen hilfreichen Schritt zur Optimierung von Hydrogel-DNS-Analysen in Vor-Ort-Analysen zur Pathogenidentifikation. In weiterreichenden Untersuchungen könnte das vorgestellte System auf noch größere Zeitersparnis und kleinere Nachweisgrenzen getestet werden.

### 1.3. Schlussfolgerungen

Initiiert durch die andauernden Arbeiten vieler Wissenschaftler wurden große Fortschritte in der Forschung möglich, die die Medizin bis heute revolutionierten. Weit gefächerte Forschungsgebiete konnten erschlossen werden und erbringen weiterhin originelle Methoden zur Verbesserung der Lebensqualität.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den geschichtlich gewachsenen Methoden des Spezialgebietes der DNS-Analyse mit Hydrogelen, welches durch das Bestreben getragen wird, schneller pathogene Keime zu erkennen und gezielte Fragestellungen in Umwelt und Medizin zu klären. Es konnte die Einordnung der hier vorgestellten Forschung in das historische Gesamtbild gezeigt und neue kreative Wege für DNS-Analyse mit Hydrogelen für Vor-Ort-Anwendungen erschlossen werden.

Die komfortable Ein-Schritt-Synthese beschleunigt dabei die Herstellung der Hydrogel-Arrays, indem sie die Polymerisation, Immobilisierung und Funktionalisierung in einem Prozessschritt vereint.[AB1] Durch die Initiation mit sichtbarem Licht werden zusätzliches Equipment, zeitintensive Oberflächenaktivierung und aufwendige oder giftige Anbindungschemie eingespart und eine schnelle Fabrikation der Hydrogel-dekorierten Chips innerhalb von 20 Minuten möglich. Zur Gewährleistung der besten Reproduzierbarkeit, Spot-Uniformität und Signalintensität geben die Untersuchungen in [AB1] dem Anwender das passende Werkzeug für optimale Ergebnisse.

Weiterhin gelang es die Strategie der DNS-Detektion durch enzymatisch generierte Silberpartikel von 2D-Oberflächen auf 3D-Hydrogele zu übertragen.[AB2] Überaus wichtig ist hierbei der Nachweis über die Erschließung des Gesamtvolumens der Hydrogel-Tropfen. Dieser wurde durch die Kryobrush Methode und energiedispersive Röntgenspektroskopie erbracht und damit gezeigt, dass die Gele die Diffusion großer Makromoleküle und deren Interaktion innerhalb der Matrix erlauben. Damit ist erstmalig die DNS-Detektion mit bloßem Auge mittels eines Hydrogel-Arrays umgesetzt.

Darüber hinaus wurde eine gänzlich neue Methode entwickelt, die die Prozessschritte von Isolierung der DNS, deren Aufreinigung, Anpassung der Pufferlösung, PCR bis Hybridisierung in einem einzigen Schritt zusammenfasst. Dies erlaubt eine erstaunliche Zeitersparnis und stellt einen entscheidenden Schritt zur Verbesserung von Vor-Ort-DNS-Detektionen dar. Die Ausarbeitung in [AB3] beschreibt die Überlegenheit dieser „all-in-one“ 3D-Hydrogel-PCR



gegenüber einer 2D-Chip-PCR. *E. coli*-Keime können auf diesem Wege sogar direkt aus der komplexen Matrix des synthetischen Urins nachgewiesen werden. Überdies konnte auf diese Weise eine neuartige Möglichkeit erschlossen werden DNS nach einer symmetrischen PCR (nur doppelsträngiges Produkt) ohne vormalige Doppelstrang-Zerlegung für eine Hybridisierung mit den einzelsträngigen Fängersonden zugänglich zu machen. Die PCR intrinsische DNS-Schmelzung der sich wiederholenden PCR-Zyklen liefert hierbei schon das einzelsträngige Produkt. Eine symmetrische PCR erbringt eine höhere Produktmenge, daher liefert dieser Prozess eine höhere Signalstärke als ein Ansatz mit einer asymmetrischen PCR.[AB3]

Mit der geschichtlichen Eingliederung der hier angewandten Methoden ist dem Leser das Nachvollziehen der beschriebenen Arbeit erleichtert und kann damit den Weg für eine kreative Fortsetzung dieser Forschung in Zusammenarbeit mit anderen Fachdisziplinen ebnen.

### **1.3. english conclusion**

Initiated by the continuing works of many scientists, great advances in science were made possible revolutionizing the field of medicine until today. A wide range of research fields could be accessed and continually provide with original methods for enhancing life quality.

The here presented research deals with the historically grown methods in the specific area of DNS-analysis with hydrogels, which is operated by the attempt to fasten the detection of pathogens and answer specified environmental and medical questions. A classification of the presented research within the historical context was shown and new creative ways for DNA analysis with hydrogels for on-site applications were developed.

The convenient one-step synthesis thereby accelerates the production of the hydrogel arrays by combining the polymerization, immobilization and functionalization in one process step. [AB1] Because of the initiation via visible light this process involves no extra equipment, time-consuming surface activation and expensive or toxic binding chemistry. The fabrication of the hydrogel decorated chips is achieved within 20 minutes. To ensure the best reproducibility, spot uniformity and signal intensity the investigations in [AB1] provide the user with the tools for optimal results.

The strategy of DNA detection by enzymatically generated silver particles of 2D surfaces could successfully be transferred to 3D hydrogels [AB2]. Especially important here is the proof of the silver particle development inside total volume of the hydrogel drops. This was realized by the cryofracture method and energy dispersive X-ray spectroscopy, thus demonstrating that the gels allow for diffusion of large macromolecules and their interactions within the matrix. Thereby, the first naked eye DNA detection by means of a hydrogel array is obtained.

In addition, an entirely new method has been discovered, which enables the combination of DNA isolation, purification, adjustment of the buffer conditions, PCR and hybridization into a single step. This permits a huge time saving and represents a crucial advancement for in on-site-DNA-detection. The research presented in [AB3] describes the superiority of this "all-in-one" 3D-hydrogel-PCR compared with a 2D-chip-PCR. In this way, *E. coli* bacteria can be detected directly from a complex matrix like synthetic urine. Moreover, an entirely new technique could be developed to allow DNA produced by a symmetric PCR (only double stranded product) to enter hybridization with the single stranded capture probes without former double-strand-separation. The PCR intrinsic DNA melting steps during the repetitive cycles of PCR hereby already provide for the single stranded product. A symmetric PCR yields a higher product amount and produces therefore a higher detection signal than an approach with an asymmetric PCR.[AB3]

By the demonstration of the connection between this work and the historical methods the reader is enabled full comprehension. This paves the way for a creative continuation of this research in collaboration with other disciplines.

## 2. Veröffentlichungen

Für alle in dieser kumulativen Dissertation verwendeten Manuskripte liegen die notwendigen Genehmigungen der Verlage („reprint permission“) für die Zweitpublikation vor.

Die Koautoren der in dieser kumulativen Dissertation verwendeten Manuskripte sind sowohl über die Nutzung, als auch über die oben angegebenen Eigenanteile an den Publikationen und Zweitpublikationsrechten bei einer kumulativen Dissertation informiert und stimmen dem zu.

Name der Promovendin	Datum	Ort	Unterschrift
----------------------	-------	-----	--------------

Ich bin mit der Abfassung der Dissertation als publikationsbasiert, d.h. kumulativ, einverstanden und bestätige die vorstehenden Angaben. Eine entsprechend begründete Befürwortung mit Angabe wissenschaftlichen Anteils der Doktorandin an den verwendeten Publikationen werde ich parallel an den Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät richten.

Name Erstbetreuer	Datum	Ort	Unterschrift
-------------------	-------	-----	--------------

Name Zweitbetreuer	Datum	Ort	Unterschrift
--------------------	-------	-----	--------------

## 2.1. Hydrogel decorated chips for convenient DNA test

[AB1]

Antje Beyer, Dana Cialla-May, Karina Weber, Jürgen Popp

Der Nachdruck der folgenden Publikation erscheint mit freundlicher Genehmigung der WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

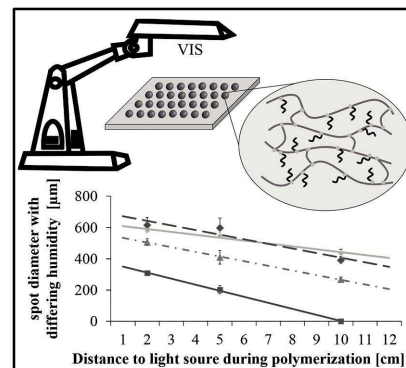
Erklärung zu den Eigenanteilen der Promovendin sowie der weiteren Koautoren an den Publikationen.

[AB1]	Autor 1: Antje Beyer	Autor 2: Dana Cialla-May	Autor 4: Karina Weber	Autor 5: Jürgen Popp
Konzeption des Forschungsansatzes	90%	5%	5%	
Planung der Untersuchungen	90%	5%	5%	
Datenerhebung	100%			
Datenanalyse und -Interpretation	85%	5%	5%	5%
Schreiben des Manuskripts	85%	5%	5%	5%
Vorschlag Anrechnung Publikationsäquivalente	1			

# Hydrogel Decorated Chips for Convenient DNA Test

Antje Beyer, Dana Cialla-May, Karina Weber,\* Jürgen Popp

Hydrogel interfaces show great potential for use in advanced deoxyribonucleic acid (DNA) detection schemes. Here, a convenient low-cost DNA functionalized hydrogel array fabrication is described. A fast one-pot synthesis is employed for the generation of highly porous acrylamide-based hydrogels on glass. No additional lengthy surface activation is needed; the matrix readily binds to the surface concomitant with polymerization and DNA functionalization of the net-work. By introduction of lithium phenyl-2,4,6-trimethyl-benzoyl-phosphinate, photoinitiated radical polymerization is attainable by visible light within 20 min. These hydrogel chips show ideal performance in application for on-site DNA detection.



## 1. Introduction

Hydrogels represent high surface area interfaces, and therefore have great capability to advance 2D detection systems. A new approach of detecting low-molecular weight compounds via molecularly imprinted polymer nanoparticles that are loaded onto a polymer network utilizes this advantage.<sup>[1]</sup> In addition, other molecules that bind according to the lock and key model can be introduced as recognition units, e.g., the macromolecule deoxyribonucleic acid (DNA). On 2D surfaces, however, the immobilization efficiency of these capture molecules is drastically reduced because of the limited available space.<sup>[2]</sup> An increased density even reduces hybridization performance because the DNA molecules lose their

specific binding capabilities.<sup>[3–5]</sup> In contrast, the immobilization capacity of DNA in a 3D volume is highly increased. Hydrogels with their porous voluminous structure create a milieu that mimics a solution phase system, which is also known to enhance hybridization activity of target probes to the gel immobilized capture probes compared to hybridization to planar surface bound capture probes.<sup>[6]</sup>

The application of gels has been widely studied and various methods have been developed. To reduce diffusion time and allow fast penetration of biomolecules into the whole gel volume, an increased porosity should be aspired. But with the higher porosity the gel structure also weakens and the received gels become very soft. Thus, a transfer of gel particles with a pinsetter between different vessels without breaking the gels is nearly impossible. Consequently, a feasible approach is to immobilize gel spots on a chip surface, since they are comfortable to handle. These microarrays are potent tools in research, since they allow parallel analytics.<sup>[7]</sup> Each gel spot functions as a 3D individual miniature test tube.

A fast and low-cost one-pot synthesis is preferred to create these highly functionalized gels concomitant with surface immobilization. Reportedly, fixation methods on glass surfaces are in need of sophisticated surface activation like silane chemistry<sup>[8,9]</sup> or click chemistry.<sup>[10]</sup> Additionally, the stability of surface immobilization

A. Beyer, Dr. D. Cialla-May, Dr. K. Weber, Prof. J. Popp  
Leibniz Institute of Photonic Technology Albert-Einstein-  
Strasse 9, 07745 Jena, Germany E-mail:  
karina.weber@ipht-jena.de

A. Beyer, Dr. D. Cialla-May, Dr. K. Weber, Prof. J. Popp  
Friedrich Schiller University Jena

Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics  
Helmholtzweg 4, 07743 Jena, Germany

A. Beyer, Dr. D. Cialla-May, Dr. K. Weber, Prof. J. Popp

InfectoGnostics, Research Campus Jena, Center for Applied

Research, Philosophenweg 7, 07743 Jena, Germany

during restricted swelling in only 2D is challenging. This can lead to deformation already for thin films on a surface,<sup>[11]</sup> strong distortion of gel cylinders<sup>[12]</sup> and subsequently, also to a rupture of bonds between gel spots and a surface.

A method without surface prepossessing was developed recently, applying benzophenone units of a previously synthesized polymer to allow radical cleavage on plastic and glass surfaces.<sup>[13]</sup> It was also reported that these gel immobilized on Polyshrink withstand its isotropical shrinking under high temperature without losing surface adhesion.<sup>[14]</sup> Still, these water-based pre-polymer solutions dry very fast, especially if they consist in small spots for arrayed microchips. This can result in uneven gel formation and a coffee ring effect.<sup>[15]</sup> Also many pre-gel mixtures dry during the polymerization process or get irradiated after drying,<sup>[13,16,17]</sup> which also leads to a decrease of spot-to-spot uniformity. However, to allow automated high-throughput readout for parallel analysis, the spot morphology and homogeneity are crucial factors.<sup>[18,19]</sup> Therefore, an as high as possible spot uniformity should be aspired. In order to reduce spot uniformities resulting from drying effects as the “coffee ring” effect, glycerol could be applied to the pre-polymer solution. The glycerol keeps the pre-polymer solution from drying before and during the polymerization. That way, the originally spotted shape will be maintained during the polymerization and lead to a crosslinked gel spot. It was reported before that a high content of glycerol does not hinder the polymerization process of acrylamide-based mixtures.<sup>[20]</sup> But Since glycerol is highly hygroscopic, the surrounding humidity has a great influence on the polymerization efficiency. Humidity can change every day and most laboratories provide no humidity control. Because of the great potential of this mixture to produce uniform gel arrays, we investigated the humidity influence in detail within this work and present the resulting solutions.

We herein report on a mechanistic study for a more stable and uniform hydrogel-based microarray fabrication. A fast and reproducible 20 min one-step polymerization is described. Important advantages are the application of visible light for radical initiation instead of UV-light, which allows polymerization without additional equipment, as we have indicated before,<sup>[21]</sup> the high spot

uniformity, and the adhesion of the hydrogel spots on glass without lengthy surface treatment. We discuss the influence of changing conditions as humidity as well as reactant concentrations on the measured data. Finally, the optimized conditions were applied to test the performance of our hydrogel decorated chips for the detection of DNA based on the 16S region of *E. coli*.

## 2. Experimental Section

### 2.1. Chemicals

Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (INNOVENT e.V., Jena, Germany), O,O'-bis(2-aminopropyl)PEG1900, glycerol, and all other chemicals, e.g., ingredients for buffers (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany), innuTaq DNA polymerase, dNTPs (Analytik Jena AG, Jena, Germany), lambda exonuclease (Roboklon GmbH, Berlin, Germany), acrydite modified oligonucleotides (IDT Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium; Table1), as well as Cy3.5 and phosphate modified Primers (Euro-fins MWG Operon, Ebersberg, Germany; Table 1) were used without further purification.

### 2.2. Bis-Acrylamidopropyl-Polyethylene Glycol(PEG)1900 Synthesis

After dissolving 3.2 mmol (6.4 g) O,O'-bis(2-aminopropyl) PEG1900 in 20 mL dichloromethane (DCM), 7.7 mmol (1 mL) freshly distilled triethylamine were added under an argon atmosphere and cooled to 0 °C. During constant stirring, 7 mmol (0.55 mL) acrylic acid chloride (dissolved in 12 mL DCM) were added dropwise. The formed hydrochloride was filtered after 1 h and the solvent evaporated. The remaining product was washed three times with 30 mL methanol, dried under vacuum, and stored at -20 °C.<sup>[22]</sup>

### 2.3. Hydrogel Array Fabrication

The glass chips were washed 1 min each in acetone, ethanol, and water. The monomer solution was prepared by mixing 4% (w/v) N,N'-dimethylacrylamide, 0.6% (w/v) of the crosslinker bis-acrylamidopropyl-PEG1900, and 60% glycerol (v/v) in deionized water (DIW).<sup>[21]</sup> Lithium phenyl-2,4,6-trimethyl-benzoyl-phosphinate<sup>[23]</sup> was dissolved in DIW (0.5% w/v) and stored at 4 °C until application. Just before spotting 5 µL of monomer solution

Table 1. Primers and capture probes.

DNA	Sequence 5'-3'	Modification	Target
16S-part F	GGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGG	5'-Cy3.5	Eco4
16S-part R	CCCTACGGTTACCTTGTTACGAC	5'-phosphate	
Eco1	TTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGCAAAGAG- CAAGCTTCTTCCTGT	5'-acrydite	
Eco4	TTTTTTTTTTTTTTTTTGAATCACAAAGTGGAAGCG	5'-acrydite	



0.75  $\mu\text{L}$  acrydite-DNA (capture DNA, sequences Eco1 or Eco4; Table 1) and 0.25  $\mu\text{L}$  photoinitiator (PI) lithium phenyl-2,4,6-trimethyl-benzoyl-phosphinate were mixed. This pre-polymer solution was spotted by piezoelectric pipetting Nano-Plotter NP 2 (GeSiM, Grosserkmannsdorf, Germany, 0.1  $\mu\text{L}$  per spot). Directly after spot-ting the chips were illuminated for 20 min with visible light by a standard laboratory lamp (Daylight Slimline Magnifying Lamp, 22W/T5 fluorescent tube). Finally, the chips were rinsed for 5 min in purified water.

For fluorescence signal analysis after hybridization, alterations of the DNA concentration were performed. To ensure comparability and sufficient annealing time, a hybridization period of 2 h for these experiments was chosen. To investigate the influence of the PI concentration on the hybridization performance, we changed its concentration in further experiments. To prove that the protocol can be accelerated, a hybridization period of 1 h was applied for these tests.

## 2.4. Spot Size Analysis and Humidity Control

Due to the above-described non-contact printing, a homogeneously circular shape of spots could be achieved. Because of exact control of dispensing 0.1  $\mu\text{L}$  of pre-polymer solution per spot, a high reproducibility of spot size was assured. To characterize the spot size in dependence of changing environmental conditions, the pre-polymer solution was spotted onto several glass chips. One out of each batch was imaged by a Zeiss Microscope Axio Imager.Z1 immediately after spotting, while the other chips were irradiated to polymerize the pre-polymer droplets into hydrogels. After 20 min of illumination, the hydrogel chips were rinsed in water, investigated under the microscope, and the spot diameters were measured in the images with the help of the associated software of Zeiss. For every batch of changing reaction conditions, five spot replicates were produced and investigated. On each spot we performed five diameter measurements. For the calculation of the mean spot diameter and standard deviation all the 5 x 5 measurements were included for every batch to ensure significance of the statistical analysis. This procedure was repeated on different days of different humidity. In additional experiments, we attempted to reduce the humidity of the ambient air during the polymerization reaction. To this end, the bottom of a 60 x 15 mm<sup>2</sup> petri dish was covered with 5 g of  $\text{CaCl}_2$ . The arrayed glass chips were transferred in this open petri dish for polymerization. For further stabilization of the humidity conditions, the petri dish was covered to create a microenvironment of low humidity. Different lid materials were tested regarding their influence on the gel formation efficiency:  $\text{CaF}_2$  glass (0.8 mm), quartz glass (0.5 mm), Polystyrene (petri dish lid 1 mm), and standard microscopic slides (1 mm).

## 2.5. DNA Amplification, Single Strand Generation, and Hybridization

The polymerase chain reaction (PCR) of a 100 bp fragment of the 16S rDNA region was carried out with primers listed in Table 1. The forward primer was tagged with a 5'-Cy3.5 and the reverse primer with 5'-phosphate to allow a lambda exonuclease

treatment generating single-stranded DNA. The 50  $\mu\text{L}$  PCR volume included 0.25 x 10<sup>-6</sup> M forward/reverse primer, 2 x 10<sup>-3</sup> M  $\text{MgCl}_2$ , 1x PCR buffer, 0.25 x 10<sup>-3</sup> M dNTPs, 2.5 units innuTaq DNA polymerase and 4 ng genomic DNA. The PCR reactions were performed applying a thermocycler (FlexCycler<sup>2</sup>, Analytik Jena AG, Jena, Germany). Thereafter 10  $\mu\text{L}$  PCR product was digested at 37 °C for 15 min with 37.5 units of lambda exonuclease in 1x exonuclease buffer. Afterward, the enzyme was disabled by heating to 75 °C for 10 min. Finally, 30  $\mu\text{L}$  of the resulting PCR product was mixed in 3x SSC/ 0.5% SDS hybridization buffer. The solution was transferred onto the hydrogel array and incubated at 40 °C.

## 2.6. Microscopic Measurements

The fluorescence signals were documented by a Zeiss Microscope Axio Imager.Z1 and HBO 100 W lamp (Carl Zeiss, Jena, Germany). The images were examined by gray value scaling (Program Image J) and the brightness ratio of the fluorescence recorded on the hydrogel spots compared to the background was calculated. Five random measurement points of the gray value of spot and of the background were taken to calculate the mean fluorescence intensity of each spot. The mean values and standard deviation were calculated and plotted.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Fast and Easy Preparation of Hydrogel Decorated Chips

To fabricate chips with hydrogel spots in an arrayed form, glass surfaces are applied. By doing so, no additional surface modification is necessary, since the mon-omer N,N'-dimethylacrylamide is known for its strong adhesive properties to glass. In general, surface bondage problems (even on chemically activated surfaces) are attributed to the huge volume changes of hydro-gels under different humidity conditions. To prevent the spots from drying during the polymerization, the employed monomer mixture contained 60% of glycerol in our experiments. When immersed in water after polymerization, the glycerol is then evenly replaced by water without further swelling of the network. Since there is now no swell stress, we achieve an increased stability of the hydrogel droplets on the glass surfaces. Moreover, different hydrogel array layouts are attainable with an automated spotter described above. In Figure 1A, the gel spots on a 1 x 2.6 x 0.1 cm<sup>3</sup> glass are displayed. We observed that all hydrogel droplets are robustly fixed on the surface and withstand several washing steps. Additionally, SEM images (Figure 1B,C) of the freeze dried network illustrate its very high porosity due to holes with diameters in the range of 10  $\mu\text{m}$ . Based on these results, a penetration of macromolecules, e.g., DNA into the hydrogel volume is expected.

Materials  
Views

www.MaterialsViews.com

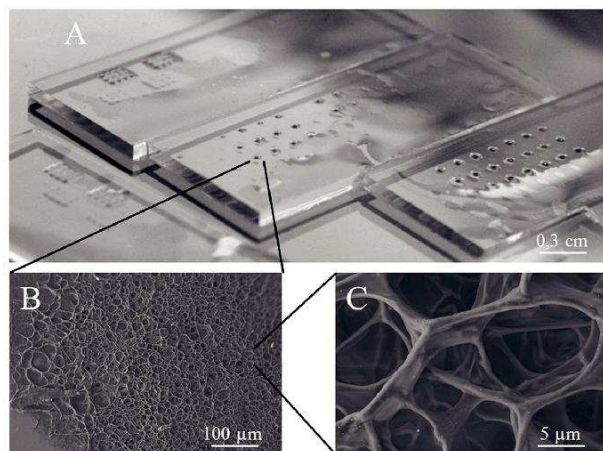
Macromol. Chem. Phys., DOI: 10.1002/macp.201500439

© 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Macromolecular  
Journals

Early View Publication; these are NOT the final page numbers, use DOI for citation !!





**Figure 1.** A) Different hydrogel spot arrays on 1 x 2.6 cm<sup>2</sup> cut standard microscopic slides and B,C) SEM images of freeze dried hydrogel in two different resolutions.

### 3.2. Humidity Influence on Hydrogel Generation

Since our pre-hydrogel mixture contains a high amount of glycerol, which is hygroscopic, a high humidity of the ambient air has an effect on the polymerization of these small droplets. Therefore, we performed the polymerization of the pre-polymer solution on different days of different given humidity. It was measured with a standard hygrometer. To show the influence of the humidity in more detail, three different light intensities for polymerization were applied. The SI unit of illuminance  $E$  is the lux. If the illuminated surface is vertically arranged to the light propagation direction, it generates by approximation an illuminance  $E$  calculated by Equation (1) below

$$E = \frac{I}{r^2} = \frac{1900 \text{ lm}}{0,02 \text{ m}^2} = 4750000 \text{ lx} \quad (1)$$

With the given light intensity (1900 lumen) of the applied 22W/T5 fluorescent tube and the chosen distances  $r$  to the light source of 2, 5, and 10 cm, the resulting illuminance on the chip surface can be calculated as 4750, 760, and 190 klx. The light intensity decreases exponentially (a graphical illustration is found in the Supporting Information). The size of freshly spotted pre-polymer droplets is 710.3 x 83.8 µm. In Figure 2, the correlation between the spot size of the hydrogel droplets after polymerization and the distance to the lamp inducing polymerization for various environmental conditions is plotted.

The continuous graphs illustrate decreasing spot diameters with decreasing of the light intensity by enlarging the distance to the light source during polymerization for humidity values of 30 and 50%. It is easily perceived that a humidity increase of 20% already has a huge effect on the resulting spot diameter. As expected, a higher humidity accounts for a smaller spot diameter, since

water penetrates deeper into the pre-polymer droplet, dilutes the pre-gel mixture, and thus hinders gel formation, which remains only possible in the undiluted pre-polymer spot interior. In the same way, an extension of the distance to the light source is responsible for a smaller spot size because the light intensity for activation of the PI is decreased. A humidity of 50% and a distance of 10 cm to the light source therefore result in a total hindrance of network formation. By introducing dehumidification of the ambient air by the hygroscopic salt CaCl<sub>2</sub>, a strong increase in the received spot size is detectable at a humidity of 50% (dotted dark gray data). Additionally, the spot diameter for desiccation with CaCl<sub>2</sub> at 70% humidity is plotted (dotted gray data). Without dehumidifying, gel formation would not be observed at all. Therefore, the dehydration of the gel surrounding air for the period of the polymerization is a necessary operation to improve spot uniformity and ensure the same gel volume distribution for ongoing experiments. At a given humidity of 30% its influence vanishes and the resulting gel spot diameters for 2 and 5 cm give comparable results.

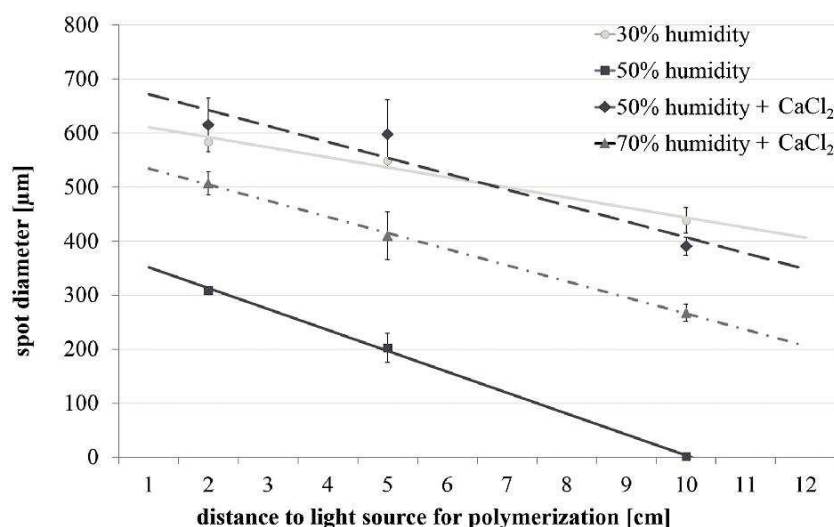
Continuing examination was performed by closing the petri dish with coverage of differently light permeable materials (Figure 3). The results of drying the ambient air in an uncovered petri dish filled with CaCl<sub>2</sub> are comparable with spot diameters achieved by a closed petri dish during polymerization. Due to this closing, a micro-environment with almost no humidity is formed and renders the experiment independent of the humidity of the ambient air. Therefore, the original spot diameter after spotting is preserved and the droplets turn into completely polymerized gels. The maximum spot size and polymerization efficiency could be achieved using CaF<sub>2</sub> and quartz glass as coverage material. In the absence of humidity control in the laboratory we recommend this procedure. However, this method gives only improved results at a lamp distance of 2 cm. With a larger distance polymerization is hindered due to the light intensity decrease originating in the differing light permeability of the different coverage materials. Whereas CaF<sub>2</sub> and quartz glass still allow gel formation at 5 cm distance of the light source, the polystyrene of the petri dish lid and glass of the standard microscopic slides only allow gel formation for 2 cm distance. Still we suggest that if the humidity remains under 50%, the polymerization is more conveniently carried out just with CaCl<sub>2</sub> application in an uncovered petri dish, since the variance of spot size is still within the variance of spot diameters right after spotting.

### 3.3. Receiving Optimized Gels for DNA Detection

In the last paragraph, the influence of the light intensity on the polymerization efficiency was discussed. Additionally, also the PI concentration should have a strong effect.

Materials  
Views

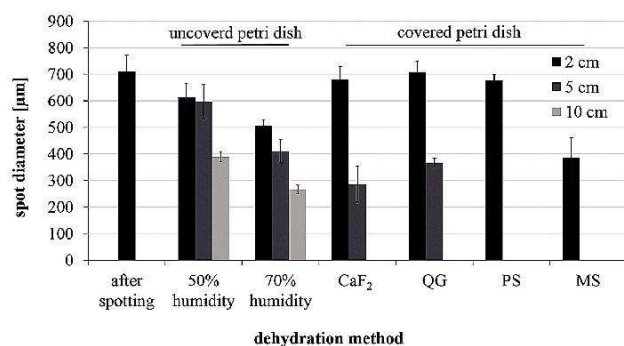




**Figure 2.** Spot diameter as function of the light source distance for different environmental conditions. The initial spot size directly after spotting is  $\sim 700 \mu\text{m}$ . Trend lines were introduced for better visualization.

Hence, experiments with decreasing PI amount from 0.1% to 0.03% w/v were performed (30% humidity). In Figure 4, the correlation between spot diameter and PI concentration for various distances to the light source is illustrated. As expected the polymerization efficiency decreases with decreasing concentration of the radical providing agent. The same tendency was obtained for all tested distances between the chip surface and the light source. Furthermore, a 200–500% increase of the standard variation is detected when using 10 cm distance to the light source during polymerization. This accounts for a high increase of spot to spot inhomogeneity, therefore we advise the use of 2 and 5 cm for lamp distance.

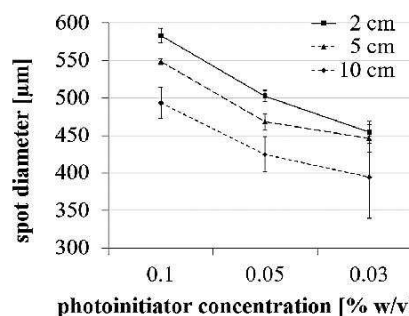
In a next step, the droplet decorated chips were incubated with target DNA solution to allow hybridization



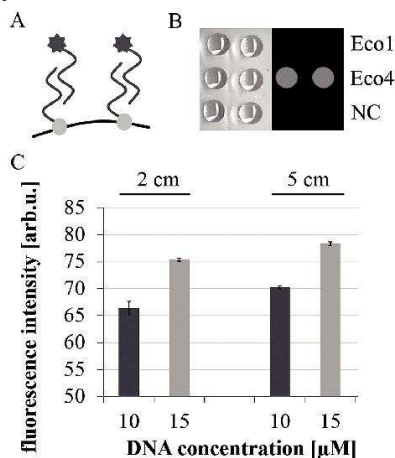
**Figure 3.** Resulting spot size at different humidity and drying conditions for varied distances to the light source. Starting from left: spot size after spotting, at 50 and 70% humidity in uncovered petri dish, after drying in petri dish covered with a lid consisting of  $\text{CaF}_2$ , quartz glass (QG), polystyrene (PS), and a microscope glass slide (MS).

to gel bound capture DNA. To investigate the efficiency of binding target molecules within this hydrogel matrix in terms of pathogen diagnostics, the amplified DNA (by means of PCR) is labeled with the fluorescent dye Cy3.5 (see Figure 5A). Furthermore, we immobilized different DNA capture probes into the hydrogels (Figure 5B), whereas the sequence Eco4 is complementary to the Cy3.5 labeled 100 bp fragment amplified from bacteria isolated 16S ribosomal gDNA (16S rDNA). The sequence Eco1 was non complementary to this PCR product. Additionally, a negative control (NC) and a sample with hydrogel spots without immobilized DNA were included into the measurements. In Figure 5B, the bright field as well as the fluorescence image is illustrated. A strong fluorescence intensity

is detected for the hydrogel droplets containing Eco4 as capture sequences, whereas the spots labeled with Eco1 and NC show no fluorescence. This result supports the applicability of hydrogel droplets for specific DNA detection, since no unspecific binding of the target DNA to the hydrogel matrix takes place. Moreover, the capture DNA concentration of the Eco4 probe ( $10 \times 10^{-6}$ ,  $15 \times 10^{-6}$ , and  $20 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) was varied during polymerization and the resulting fluorescence intensity is plotted as function of the concentration as well as distance to the light source (see Figure 5C). A signal increase as a consequence of applying  $15 \times 10^{-6} \text{ M}$  of DNA instead of  $10 \times 10^{-6} \text{ M}$  can be deduced, which is attributed to an increased immobilization effectiveness into the growing network. A too high DNA concentration might sterically hinder the polymerization, which might be the reason that a pre-polymer mixture containing  $20 \times 10^{-6} \text{ M}$  DNA was not forming a stable gel anymore and hybridization with target DNA could not be performed.

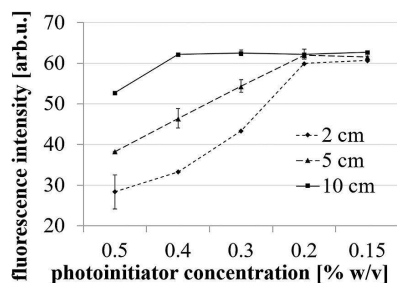


**Figure 4.** Dependency of the spot diameter on the variation of PI concentration at different distances to the light source during polymerization.



**Figure 5.** A) Schematic illustration of hybridization of Cy3.5 labeled PCR product to gel immobilized capture probes (Eco1 non-complementary, Eco4 complementary, NC negative control without DNA), B) bright field image (left) and fluorescence image of hydrogel droplets illustrating the specific binding of PCR amplified product to the complementary capture probe Eco4, C) fluorescence signal intensity for varying target DNA concentration.

Finally, we investigated the influence of the PI concentration and light source distance on the fluorescence signal intensity by employing  $10 \times 10^{-6}$  M DNA during the hydrogel fabrication to capture the Cy3.5 labeled PCR product (see Figure 6). A PI amount higher than 0.03% w/v leads to different fluorescence intensities after polymerization at different distances to the light source. Here, an increase of the fluorescence intensity with growing distance was observed. This might be attributed to a high radical concentration when applying high PI concentrations and strong light intensities. The higher the radical initiation intensity the more the reaction of fast reacting small molecules is preferred. Since oligonucleotides are large macromolecules, they are sterically hindered to immobilize in the gel matrix. Therefore, at higher light intensity, less capture DNA is immobilized within the hydrogel matrix.



**Figure 6.** Fluorescence signal intensity as function of changing PI concentration and different light source distances during polymerization.

Additionally, a higher amount of radicals could lead to unwanted reactions between or within bases and create DNA lesions that hinder later hybridization of PCR products. Nevertheless, a PI concentration of 0.03% w/v levels out this effect and leads to strong signals, which are not increased with further lowering of PI concentration. Altogether, even though a higher amount of PI leads to more efficient polymerization, it does not increase the fluorescence outcome signal. Thus, a low PI concentration is preferred to generate hydrogel droplets containing capture DNA probes for the specific detection of dye-labeled PCR products within this matrix.

To conclude, the results of our experiments for best outcome signal suggest a DNA concentration of  $15 \times 10^{-6}$  M, a PI concentration of 0.03% and a working distance of 5 cm for the light induced polymerization, as optimal parameters. Under these conditions however, the received spots will be smaller, than the originally spotted pre-polymer droplets. If the interest of research is not the outcome signal alone but also the maintenance of the spotted diameter of the hydrogel droplets, we suggest the alteration of the PI concentration to 0.1% and the distance to the light source of 2 cm.

## 4. Conclusions

Within this contribution we have investigated the effect of various reaction parameters on a one-step hydrogel array production on the basis of acrylamides and glycerol. We explored the criteria for best performance and uniformity of the gel chip array in terms of specific DNA detection schemes. This simple hydrogel chip fabrication can be managed without additional equipment like UV lamp for polymerization because initiation is possible by visible light. Furthermore, no lengthy surface preprocessing is needed to immobilize the network on glass. The resulting robust and highly uniform gel pad array is able to withstand numerous washing steps. Due to the high porosity, the gels represent ideal probe volumes for parallel DNA hybridization and detection. Based on our results, a fast and simple preparation regarding the influential factors can be accomplished fitting to the user's application requirements.

## Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements: Funding of the research projects "Wachstumskern BASIS – Bio Analytics and Surfaces for Integrations in System" (03WKCB01H) within the framework "Innovative regionale Wachstumskerne," "JBCI 2.0" (03IPT513Y)

within the framework “InnoProfile-Transfer,” Unternehmen Region, and “InfectoGnostics” Research Campus (13GW0096F) by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF), Germany is gratefully acknowledged.

Received: October 15, 2015;

Revised: December 21, 2015;

Published online: ; DOI: 10.1002/macp.201500439

Keywords: DNA; functionalization of polymers; Hydrogel decorated chips; one-pot synthesis; photopolymerization

- [1] N. Sharma, C. Petri, U. Jonas, M. Bach, G. Tovar, K. Mrkvová, M. Vala, J. Homola, W. Knoll, J. Dostálek, *Macromol. Chem. Phys.* **2014**, *215*, 2295.
- [2] M. Moschallski, J. Baader, O. Prucker, J. Ruhe, *Anal. Chim. Acta* **2010**, *671*, 92.
- [3] D. A. Zubtsov, E. N. Savvateeva, A. Yu. Rubina, S. V. Pan'kov, E. V. Konovalova, O. V. Moiseeva, V. R. Chechetkin, A. S. Zasedatelev, *Anal. Biochem.* **2007**, *368*, 205.
- [4] A. W. Peterson, R. J. Heaton, R. M. Georgiadis, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 5163.
- [5] G. Arrabito, B. Pignataro, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5450.
- [6] H. Bunemann, *Nucleic Acids Res.* **1982**, *10*, 7181.
- [7] J. D. Hoheisel, *Nat. Rev. Genet.* **2006**, *7*, 200.
- [8] H. Berney, K. Oliver, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 618.
- [9] B. Lillis, M. Manning, H. Berney, E. Hurley, A. Mathewson, M. Sheehan, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1459.
- [10] M. Arslan, O. Gok, R. Sanyal, A. Sanyal, *Macromol. Chem. Phys.* **2014**, *215*, 2237.
- [11] M. K. Kang, R. Huang, *J. Mech. Phys. Solids* **2010**, *58*, 1582.
- [12] Z. Xiao, M. Li, J. Zhou, *Acta Mech. Solida Sin.* **2012**, *25*, 550.
- [13] T. Neumann, A. J. Bonham, G. Dame, B. Berchtold, T. Brandstetter, J. Ruehe, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6124.
- [14] G. C. Le Goff, L. J. Blum, C. A. Marquette, *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 227.
- [15] Y. Zhang, Y. Qian, Z. Liu, Z. Li, D. Zang, *Eur. Phys. J. E* **2014**, *37*, 84.
- [16] A. J. Bonham, T. Neumann, M. Tirrell, N. O. Reich, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e94.
- [17] J. Tang, P. Xiao, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1817.
- [18] J. A. Rebhahn, C. Bishop, A. A. Divekar, K. Jimenez-Garcia, J. J. Kobia, F. E. Lee, G. M. Maupin, J. E. Snyder-Cappione, D. M. Zaiss, T. R. Mosmann, *Comput. Methods Programs Biomed.* **2008**, *92*, 54.
- [19] M. Egmont-Petersen, D. de Ridderb, H. Handels, *Pattern Recognit.* **2002**, *35*, 2279.
- [20] F. N. Rehman, M. Audeh, E. S. Abrams, P. W. Hammond, M. Kenney, T. C. Boles, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 649.
- [21] A. Beyer, S. Pollok, A. Berg, K. Weber, J. Popp, *Macromol. Biosci.* **2014**, *14*, 889.
- [22] M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3077.
- [23] T. Majima, W. Schnabel, W. Weber, *Makromol. Chem.-Macromol. Chem. Phys.* **1991**, *192*, 2307.



## 2.2. Easy Daylight Fabricated Hydrogel Array for Colorimetric DNA Analysis

[AB2]

Antje Beyer, Sibyll Pollok, Albrecht Berg, Karina Weber, Jürgen Popp

Der Nachdruck der folgenden Publikation erscheint mit freundlicher Genehmigung der WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

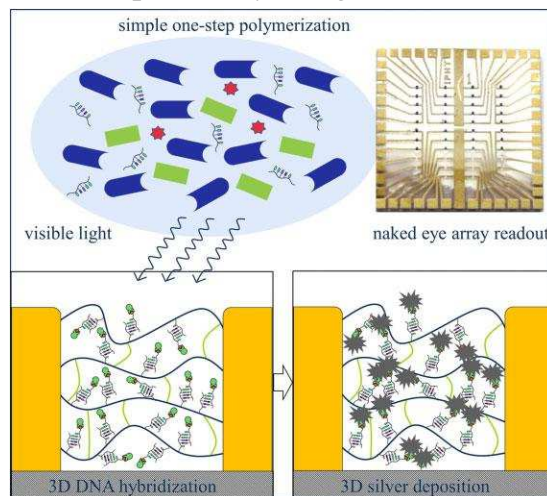
Erklärung zu den Eigenanteilen der Promovendin sowie der weiteren Koautoren an den Publikationen.

[AB2]	Autor 1: Antje Beyer	Autor 2: Sibyll Pollok	Autor 3: Albrecht Berg	Autor 4: Karina Weber	Autor 5: Jürgen Popp
Konzeption des Forschungsansatzes	50%			50%	
Planung der Untersuchungen	45%	10%	15%	30%	
Datenerhebung	90%	10%			
Datenanalyse und -Interpretation	85%	5%		5%	5%
Schreiben des Manuskripts	85%	5%		5%	5%
Vorschlag Anrechnung Publikationsäquivalente	1				

# Easy Daylight Fabricated Hydrogel Array for Colorimetric DNA Analysis

Antje Beyer, Sibyll Pollok, Albrecht Berg, Karina Weber,\* Jürgen Popp

The fabrication of 3D hydrogel microarrays for DNA analytics that allow simple visual signal readout for on-site applications is described. A convenient one-step polymerization of the hydrogel including in situ capture oligonucleotide immobilization is accomplished by using N,N'-dimethylacrylamide/polyethylene glycol (PEG<sub>1900</sub>)-bisacrylamide monomers. The implementation of an acylphosphine-oxide photoinitiator even allows polymerization at daylight, whereas other approaches require exposure with light in the UV-range. This minimizes the risk of UV-caused DNA damages within the capture DNA-strand that could adversely affect the subsequent hybridization step. The porous network of these gel segments allows DNA as well as protein penetration. Thus, the successful in-gel DNA hybridization is monitored by the deposition of silver nanoparticles. These metal particles allow naked eye signal readout.



## 1. Introduction

Hydrogels are hydrophilic crosslinked polymers that form flexible porous matrices. There is a tremendous repertoire of possible natural and synthetic monomer entities as well as crosslinkers.<sup>[1–2]</sup> Due to their hydrophilic components and the intrinsic channel formation, they possess a high water penetration capability, causing swelling of the structure.<sup>[3]</sup> Thus, they mimic the mesh-like structure of the cell interior or even that of the extracellular matrix and are therefore particularly suitable for simulating biochemical interac-

tions of macromolecules. Deoxyribonucleic acids (DNA), ribonucleic acids (RNA), and proteins require complex hydration shells for proper reactivity; consequently hydro-gels were extensively studied as putative reaction scaffolds, such as DNA carriers.<sup>[4]</sup>

Various methods for DNA detection are still being investigated employing, among others, nanowire<sup>[5]</sup> or lab-on-chip technology,<sup>[6,7]</sup> Fourier transform infrared spectroscopy,<sup>[8]</sup> surface plasmon resonance based biosensor techniques,<sup>[9]</sup> or fluorescence alteration (UV spectro-photometer) via adsorption to a fluorescent polymer.<sup>[10]</sup> In recent years, diverse hydrogel compositions were tested as materials that allow the generation of high surface areas for improved DNA immobilization. In the early 1980 s, Bunemann<sup>[11]</sup> demonstrated that the accessibility of linked DNA in acrylamide gels was significantly higher than for hybridization just on planar surfaces. Based on these results, various strategies for DNA immobilization within hydrogels have been developed. The polymerization of

functionalized monomers like NHS-polyethylene glycol (PEG)-acrylate<sup>[12,13]</sup> or bis-succinimidyl suberate<sup>[14]</sup> for coupling of amino-modified DNA was accomplished. Furthermore, the binding of amino-terminated DNA

A. Beyer, Dr. S. Pollok, Dr. K. Weber, Prof. J. Popp  
Leibniz Institute of Photonic Technology e.V., Albert-Einstein-  
Strasse 9 07745, Jena, Germany  
E-mail: karina.weber@ipht-jena.de  
A. Beyer, Dr. S. Pollok, Dr. K. Weber, Prof. J. Popp  
Institute of Physical Chemistry and Abbe Centre of Photonics,  
Friedrich-Schiller-University Jena, Helmholtzweg 4 07743, Jena,  
Germany  
Dr. A. Berg  
INNOVENT e.V., Prussingstrasse 27 07745, Jena, Germany





to an epoxide containing polymer, which was thereafter UV-crosslinked into a hydrogel was tested.<sup>[15]</sup>

Moreover, DNA can be immobilized simultaneously during the formation of the hydrogel. Within this context, the polymerization of gels on basis of acrylamide together with acrylamide-modified oligonucleotides was successfully performed.<sup>[16–20]</sup> Another promising approach for a combined polymerization and in situ DNA crosslinking was introduced. Within this application, amino-modified DNA participated in the polymerization process induced by exposure with UV light<sup>[21]</sup> or laser light in the visible range.<sup>[22]</sup> Also, thymine18-DNA ensured stable binding to the hydrogel components under UV irradiation.<sup>[3,23,24]</sup>

These hydrogel matrices referred to above were applicable in different sizes and forms like particles,<sup>[18]</sup> films,<sup>[13]</sup> spots-on-array,<sup>[3,15,21,23,24]</sup> inside crystal fibers,<sup>[22]</sup> or within microfluidic channels.<sup>[12,25–28]</sup>

The qualitative and quantitative measurement of DNA hybridization events within the hydrogel was usually focused on fluorescence<sup>[20,21,23,24]</sup> or chemiluminescence.<sup>[3]</sup> However, these detection methods entail some drawbacks. The bleaching of fluorescent dyes under light exposure requires a light-protected workflow as well as sample storage. In recent years, the improvement of DNA detection assays for on-site or near-patient testing of viral or bacterial pathogens led to the development of convenient read-out regimes, which were based on metallic nanoparticles.<sup>[29–32]</sup> One step in this direction was realized by combining hydrogels and colorimetric signal detection.<sup>[16]</sup> Here, the presence of target DNA on the surface of the hydrogel was traceable by naked eye due to a color change from transparent to red (gold nanoparticles) or even black (silver nanoparticles). Silver nanoparticles as an endpoint DNA-

detection tool were also successfully used in a 2D chip platform for the analysis of animal or plant pathogens.<sup>[32,33]</sup>

The aim of the present study was the creation of an alternative method for naked eye DNA detection utilizing the whole volume of the hydrogels for maximum signal output.

We herein report the development of an easy to fabricate hydrogel-microarray for visual DNA detection. As an important step in their fabrication amino- or thiol-modified DNA could be covalently linked to the hydrogel matrix

during gel polymerization. There are several advantages of the novel 3D hydrogel array. First, the fast and reproducible one-step production process of the polymer. Second, the transparency of the hydrogel allowed a simple visual detection of target DNA by a color change from transparent to black, caused by the deposition of silver nanoparticles within the complete gel volume. This approach allows a semi-quantitative DNA detection. Finally, the hydrogel polymerization is realized by application of daylight instead of UV light.

## 2. Experimental Section

### 2.1. Chemicals

Reagents and enzymes were obtained as follows: streptavidin-horseradish-peroxidase-conjugate and (3-glycidyloxypropyl)-trimethoxysilane (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany), EnzMet for general research applications (Nanoprobe, Inc., Yaphank, NY, USA), N,N'-dimethylacrylamide and N,N'-methylenebisacrylamide (Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany), lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphine (INNOVENT e.V., Jena, Germany), bovine serum albumin (BSA), and all other chemicals (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany), modified oligonucleotides (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany; Table 1).

### 2.2. Synthesis of Bis-Acrylamidopropyl-Polyethylene glycol (PEG)1900

3.20 mmol (6.400 g) O,O'-bis(2-aminopropyl)PEG1900 ("Jeffamine D 1900") were dissolved in 20 mL dichloromethane (DCM). After-wards 7.74 mmol (1.073 mL) freshly distilled triethylamine was added in an argon atmosphere and cooled in an ice bath to 0 °C. During continuous stirring, 7.04 mmol (0.569 mL) acrylic acid chloridedissolved in 12 mL DCM was added dropwise. After 60 min, the formed hydrochloride was filtered and the solvent removed by a rotary evaporator. The residue was washed three times with 30 mL methanol, dried under vacuum and stored at -20 °C.<sup>[34]</sup>

### 2.3. Hydrogel Synthesis

The monomer solution contained 4% w/v N,N'-dimethylacrylamide, 0.6% w/v of the crosslinker bis-acrylamidopropyl-PEG1900 or N,N'-methylenebisacrylamide and 60% glycerol v/v in 0.01 M

Table 1. Oligonucleotides.

Name	Sequence	5' End	3' End	Complementary to
NS150	5'-TTTTTTCAGCATGTGCTCCTTGATTCTATG-3'	NH <sub>2</sub>	–	B150
SS150	5'-TTTTTTCAGCATGTGCTCCTTGATTCTATG-3'	SH	–	B150
S24T	5'-TACGCCACTAGCTCCAAC-3'	SH	TAMRA	
B150	5'-CATAGAATCAAGGAGCACATGCTGAAAAA-3'	Biotin	–	NS150/SS150
F150	5'-CATAGAATCAAGGAGCACATGCTG-3'	FITC	–	NS150/SS150

sodium borate buffer pH 10.5. The photoinitiator lithium phenyl-2,4,6-trimethyl-benzoyl-phosphine<sup>[35]</sup> was dissolved in H<sub>2</sub>O (1% w/v) and stored at 4 °C until use. Just before spotting the required amount (1/100) of monomer solution, NH<sub>2</sub>- or SH-modified capture oligonucleotides and photoinitiator was mixed and spotted onto chips by piezoelectric pipetting Nano-Plotter NP 2 (GeSiM, Grosserkmannsdorf, Germany).

## 2.4. Generation of Arrayed Hydrogel-Spots with Immobilized DNA

Screen-printed glass chips (Heraeus Sensor Technology GmbH, Hanau, Germany) were ultrasonically cleaned in acetone, ethanol, and water, followed by a treatment with oxygen plasma. Subsequently, the surface was coated with (3-glycidyloxy-propyl)-trimethoxysilane (0.01 M in dried toluene) for 3 h at 70 °C, washed with toluene and dried. The prepared hydrogel solution was spotted into the electrode gaps and the polymerization was induced by illumination with daylight for 45 min at room temperature. Therefore, the chips were placed in front of the window to allow daylight exposure. Finally, the hydrogel arrays were rinsed for 20 min in PBS buffer.

## 2.5. In-Gel DNA Hybridization Assay

In-gel hybridization with the complementary fluorochrome- or biotin-modified target oligonucleotides (Table 1) was performed in a humidity chamber for 1 h at room temperature. The oligonucleotides were diluted in 5x saline sodium citrate buffer (0.75 M sodium chloride, 0.075 M sodium citrate) with 1% sodium dodecyl sulfate at pH 7.0.

## 2.6. Confocal Laser Scanning Microscopy

Confocal microscopic analysis was carried out with a Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Jena, Germany). A laser excitation with a wavelength of 543 nm was used for TAMRA-labeled and of 488 nm for FITC-labeled DNA. The images were processed using the associated software of Zeiss.

## 2.7. Silver Nanoparticle Deposition

The detection of biotin-labeled oligonucleotides in the hydrogel was realized by silver nanoparticle deposition.<sup>[32,36,37]</sup> A blocking step was performed with 1 M glycine buffer for 15 min at room temperature to minimize the unspecific binding of the streptavidin-horseradish-peroxidase-conjugate. The chip was then incubated with 10 mg mL<sup>-1</sup> enzyme in PBST for 1 h at room temperature. After washing in PBST and water, the EnzMet silver kit was applied as recommended by the manufacturer.

## 2.8. Optical Signal Readout

The deposition of silver nanoparticles within the hydrogel was analyzed by gray value scaling (Program Image J).<sup>[32]</sup>

## 2.9. SEM Images

A scanning electron microscope (SEM) was used to examine the silver deposition inside and on the hydrogels. After silver deposition, the hydrogel pads were vertically cut with a scalpel to make the silver particles visible in the hydrogel interior. Afterwards, the chips were mounted on a silicon wafer, sputter-coated with 5 nm NiCr and examined under the SEM (Jeol, JSM-6700F) at an accelerating voltage of 5 kV and a working distance of 16.2 and 16.4 mm. The shown ADD images were received by accumulation of the images from raster scanning and the images of detecting the reflected beam. Resulting images show therefore the material topography and material differences (higher atomic number resulting in lighter pixel).

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Generation of Arrayed Hydrogel Structures

We used a method for hydrogel spot formation on a planar array surface that involved a polymerization together with in situ DNA immobilization as depicted in Figure 1A. The gel spots could be fixed on the glass surface via the silane surface modification.<sup>[21]</sup> The epoxy groups of the silane readily react with the radically growing polymer chains. Even, intense wash processes to remove the glycerol from the hydrogel interior or even target DNA and enzyme incubation steps did not displace the gel spots (Figure 1B). It has to be considered that the micro-arrayed gold chips enabled a well-arranged spotting scheme and subsequent signal readout, but are not obligatory. First results showed the possibility of electrical readout of the silver deposition of dimethylacrylamide/N,N'-bisacrylamide-hydrogels with continuous current (data not shown).

The experimental setting was optimized to enable a convenient as well as reproducible method for a daylight-inducible photopolymerization of hydrogel spots. Other techniques require additional equipment to generate short wave UV light to induce polymerization and covalent attachment of DNA.<sup>[3,14,15,21–24]</sup> It is well documented, that the DNA base thymine itself generated radicals when irradiated with UV light.<sup>[23]</sup> Experiments revealed that approximately 10% of thymine is affected when exposed to light at 250 nm.<sup>[39]</sup> This may result in a photo-crosslinking between two adjacent thymine residues.<sup>[37,38]</sup> The formed UV-lesions are for instance thymine-dimers or (6-4)-photoproducts that lead among others to DNA damages, which could negatively affect subsequent DNA hybridization events. Our approach of using daylight for polymerization concomitant with in situ DNA immobilization reduces the risk of thymine-based DNA damages and therefore facilitates correct hybridization between complementary DNA strands. Furthermore, other photoinitiation approaches require additional UV emitters.<sup>[3,15,18,23–25]</sup>

Fairbanks et al. investigated the water soluble photoinitiator

Materials  
Views





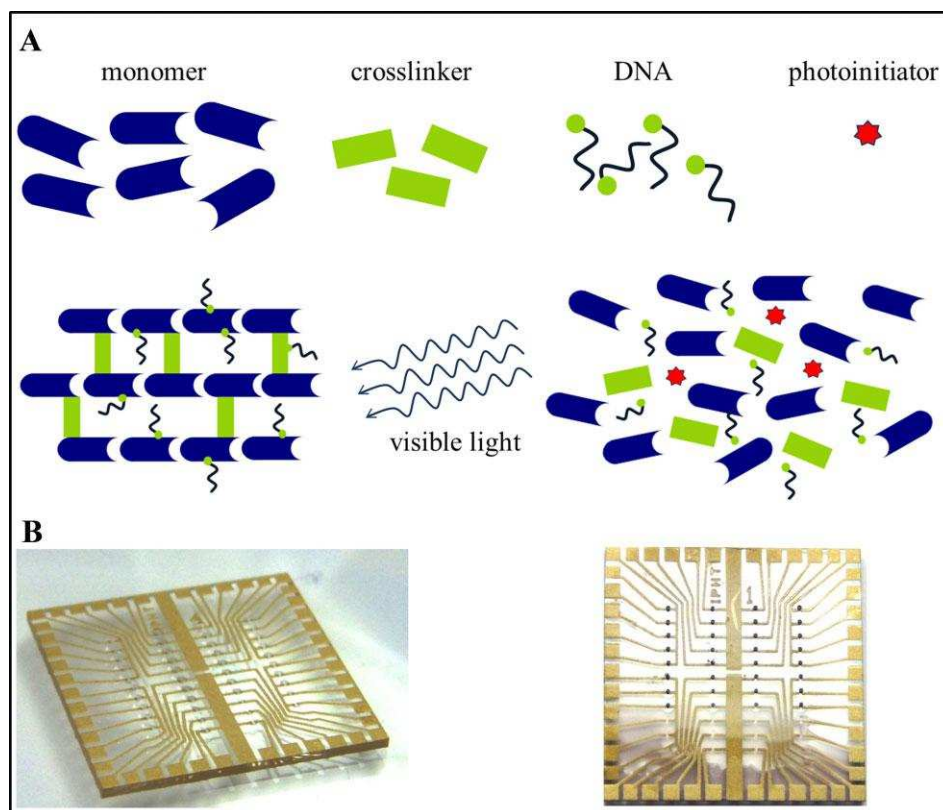


Figure 1. A) Polymerization-mediated DNA immobilization and B) arrayed hydrogel spots ( $\sim 60\ \mu\text{m}$ ) before and after silver deposition with three lower rows of hydrogel without DNA.

lithium phenyl-2,4,6-trimethyl-benzoyl-phosphinate<sup>[34]</sup> in comparison to the UV initiator I2959 and found a ten times faster polymerization time for irradiation at 405 nm.<sup>[40]</sup> So, daylight as well as every common laboratory lamp (e.g., Daylight Slimline Magnifying Lamp) with light emission in the range of 405 nm can induce the polymerization process. Another method using visible light is realized by including Eosin Y as a reaction component.<sup>[22]</sup> Since Eosin Y is a type II initiator, its chromophore persists after polymerization and hampers fluorescence measurements. In our approach, we utilize phenyl-2,4,6-trimethyl-benzoyl-phosphinate as a type I initiator,<sup>[40]</sup> which dissociates into two radicals following photon absorption. Therefore, no negative impact on the following fluorescence microscopy studies occurred.

### 3.2. Homogeneous DNA Distribution Within the Hydrogel Spots

Our investigations started with the evaluation of the homogeneity of the capture DNA immobilization and target DNA hybridization within the hydrogel spots. For this reason, fluorescent dye-labeled capture DNA was applied in hydrogel production. After washing, confocal

laser scanning microscopy showed specifically the fluorescence signal of the immobilized TAMRA-labeled  $\text{NH}_2$ -DNA in the hydrogel spot (Figure 2A). The two smaller images represent cross-sections through the hydrogel emanated from two different angles. The homogeneous signal throughout the volume reflects the equal distribution of the linked capture DNA throughout the whole gel matrix with dimensions of  $900\ \mu\text{m} \times 900\ \mu\text{m} \times 240\ \mu\text{m}$ . For evaluation of the hybridization homogeneity non-fluorescent capture  $\text{NH}_2$ -DNA was immobilized during gel forming. Thereafter, fluorescent dye-labeled target FITC-DNA was applied on the hydrogel-chip for hybridization and incubated for 1 h to allow diffusion. Of note, also the fluorescence signal for DNA-hybridization was uniformly distributed within the gel spot (Figure 2B). Thus, the hydrogel was porous enough to allow the penetration as well as the interaction of single-stranded nucleic acids. Figure 2C depicted a z-stack through the hydrogel spot representing scanning depths of 7 nm.

### 3.3. Enzymatically Generated Silver Nanoparticle Deposition in Hydrogels

We further evaluated the performance of enzymatically generated silver nanoparticle (EGNP)<sup>[32,41,42]</sup> deposition by

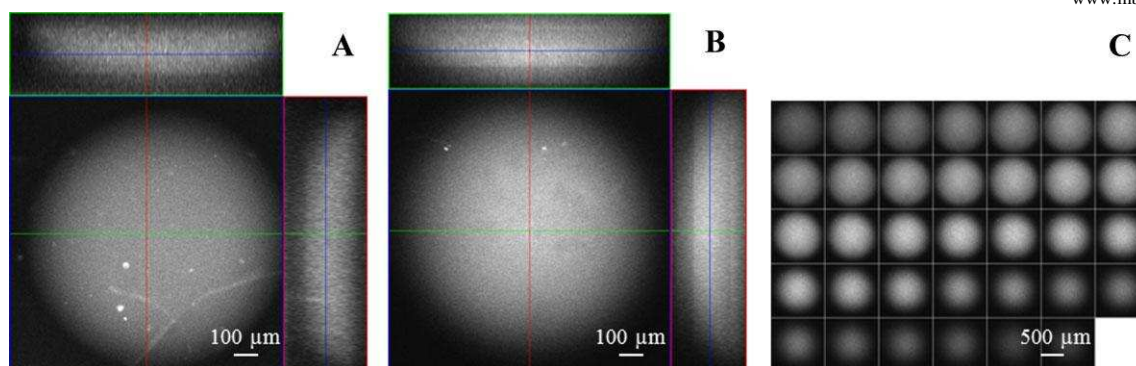


Figure 2. Confocal laser scanning microscopy images to monitor the fluorescence signal of dye-labeled DNA within the hydrogel spot. Image (A) shows the fluorescence signal of immobilized capture DNA within the gel and two cross-sectional views of its homogeneous distribution. Image (B) shows the fluorescence signal of dye-labeled target DNA after hybridization. The two cross-sectional views show its homogeneous distribution. Image (C) depicts a z-stack through the hydrogel B showing 34 scanning depths in the spot.

immobilizing biotinylated single-stranded DNA in the hydrogels. As seen in Figure 3, the silver deposition as an alternative readout increases with higher concentrations of biotinylated DNA in the gel.

As a next step, we tested the applicability of our newly established method to monitor DNA hybridization events by generating silver nanoparticles in the hydrogel spots (Figure 4). The porosity of the gel has to be high enough to allow the penetration of DNA and enzyme molecules to ensure the nanoparticle deposition within the whole interior of the hydrogel. Different approaches have been described in the literature to increase the porosity of gels. Carbon dioxide was used to create cavities within the gels.<sup>[42–44]</sup> Also a PEG monomer solution<sup>[45]</sup> or glycerol<sup>[21]</sup> were used as none participating reagents in the polymerization reaction to function as spacers. We combined the glycerol method with the usage of crosslinker molecules of different chain length: *N,N'*-methylenebisacrylamide and bis-acrylamidopropyl-PEG<sub>1900</sub>.<sup>[46]</sup> The added glycerol not only increased the pore size of the hydrogel, but also prevented the spots from drying. The minimization of drying during polymerization was crucial because dried hydrogel spots on a planar surface tend to disrupt by

swelling in water due to their confined swelling possibilities in only two dimensions.

For better visualization of the EGNP deposition, the gel segments were cut and analyzed with SEM concerning the appearance of metal particle deposits on the gel surface and interior (Figure 5). Figure 5A,E illustrate color-coded the different zones in the SEM images below for better identification. The hydrogel surface is depicted in dark blue, the cutted edge of hydrogel in light blue, and the glass surface in white. The yellow area in Figure 5A represents the gold electrode. The usage of the *N,N'*-methylenebisacrylamide did not allow the penetration of the streptavidin–horseradish-peroxidase-conjugate into the hydrogel spot (Figure 5B–D). In contrast, the PEG-enlarged crosslinker facilitated the diffusion of the protein complex into the gel volume (Figure 5F–H). Metal appears in a white color in the SEM images. Therefore, silver particles and the gold electrode could both be observed appearing in white. Due to cutting by hand, only a limited precision was accomplishable. Thus, the gold electrode is visible in Figure 5B on the gray appearing glass surface and not seen in Figure 5F. Higher magnifications (Figure 5B–D) showed the silver deposition using the spacer *N,N'*-methylenebisacrylamide

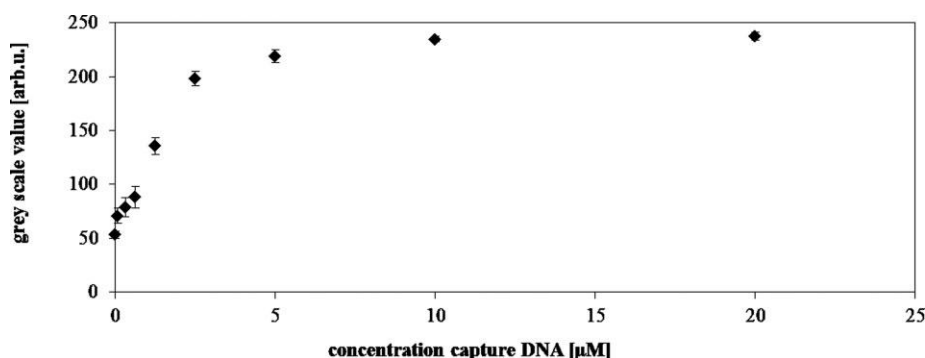


Figure 3. Dependency of silver deposition and the amount of biotinylated DNA immobilized within the hydrogel.

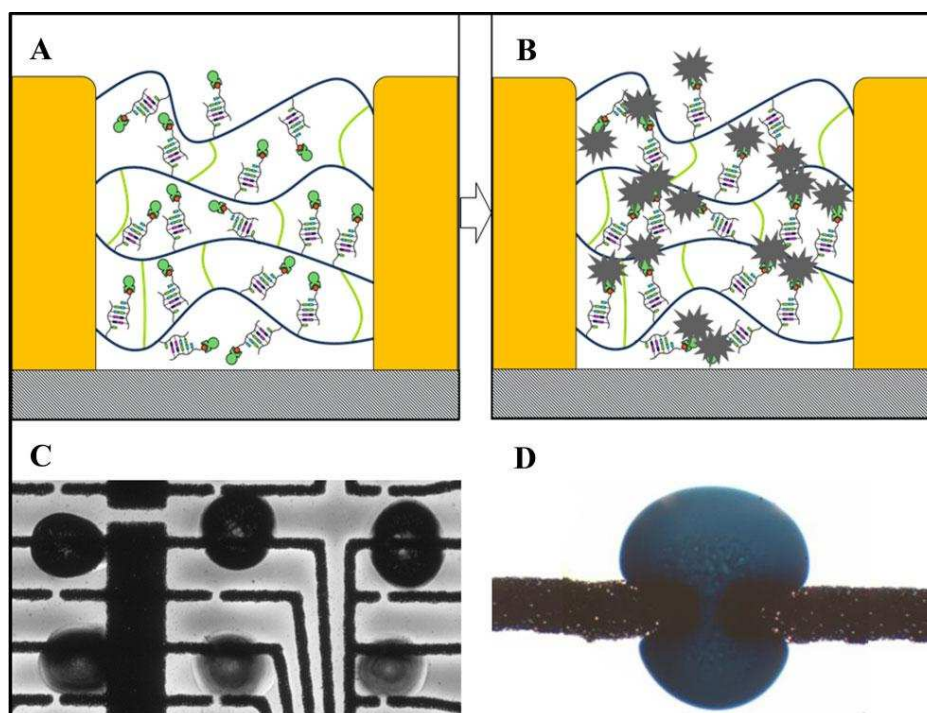


Figure 4. Scheme to monitor DNA interaction by silver nanoparticle deposition within the hydrogel volume. A) Capture DNA was immobilized within the hydrogel that is spotted between the gaps of a gold-patterned chip. The biotinylated target DNA was hybridized to the capture DNA and is further labeled by interaction with streptavidin–horseradish-peroxidase. B) Subsequently, an enzymatic generated silver deposition monitored the successful hybridization. C) Top row: hydrogel spots with 1  $\mu\text{M}$  SH-capture DNA in the hydrogel, bottom row: hydrogel spots with 1  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_2$ -capture DNA in the hydrogel; the hybridization solution contained 25 nM biotinylated target DNA. D) Shortly after the silver deposition, the hydrogel appeared in a dark blue color, reflecting the Tyndall scattering of the silver particles.

in more detail. It could be observed that the hydrogel interior remained perfectly free of silver nanoparticles. Notably, the SEM images Figure 5F–H showed the more porous hydrogel and here the silver deposition was found also in the hydrogel beneath the surface. At 10 000x and 20 000x magnification, the desert rose-shaped silver nanoparticles were detectable throughout the hydrogel spot (Figure 5H and 6). Additionally, we performed cryogenic cutting of a silver particle containing hydrogel to analyze the interior with EDX measurements. The SEM image of the cryogenically cut substrate is shown in Figure 7A. Starting from bottom to top, the glass appears in gray, followed by the hydrogel layer with white silver areas inside. The line profile EDX measurements for silver, carbon, silicon, and oxygen are presented in Figure 7B. Here, the yellow line represents the transition from glass to hydrogel, seen by decreasing signal intensities of silicon and oxygen but increasing signals of carbon (hydrogel) and silver (nanoparticles inside hydrogel).

These results imply that the interior of the hydrogel with the crosslinker bis(acrylamidopropyl)PEG<sub>1900</sub> and in situ immobilized single-stranded capture DNA was accessible for the HRP–streptavidin–quadruplex conjugate with its

hydrodynamic radius rating around 8 nm. Consequently, we used bis(acrylamidopropyl)PEG<sub>1900</sub> for the following hydrogel experiments. Taken together, our method enabled the enlargement of pore size by using both glycerol and bis-acrylamidopropyl-PEG<sub>1900</sub> to allow the diffusion of bio-molecules to their appropriate reaction sites. The covalently and homogeneously attached capture oligonucleotides were highly accessible for the complementary target oligonucleotides that penetrate the hydrogel by diffusion. Subsequently, after the DNA hybridization the influx of detection protein–complex was possible to ensure the generation of silver nanoparticles within the whole hydrogel spot volume. Thus, the presence of target DNA was easily traceable by naked eye due to the appearance of a blue-black color of the nanoparticle deposit. This is comparable to recently established hydrogel assays that ensured a colorimetric instead of fluorescence signal readout for biomolecule interaction studies.<sup>[16]</sup> The silver nanoparticles exhibit a robust endpoint, which avoid signal variations over the time caused by photobleaching and also expensive fluorescence readout devices. The deposition can be verified either by naked eye or quantitatively verified by gray value analysis.<sup>[32]</sup> The



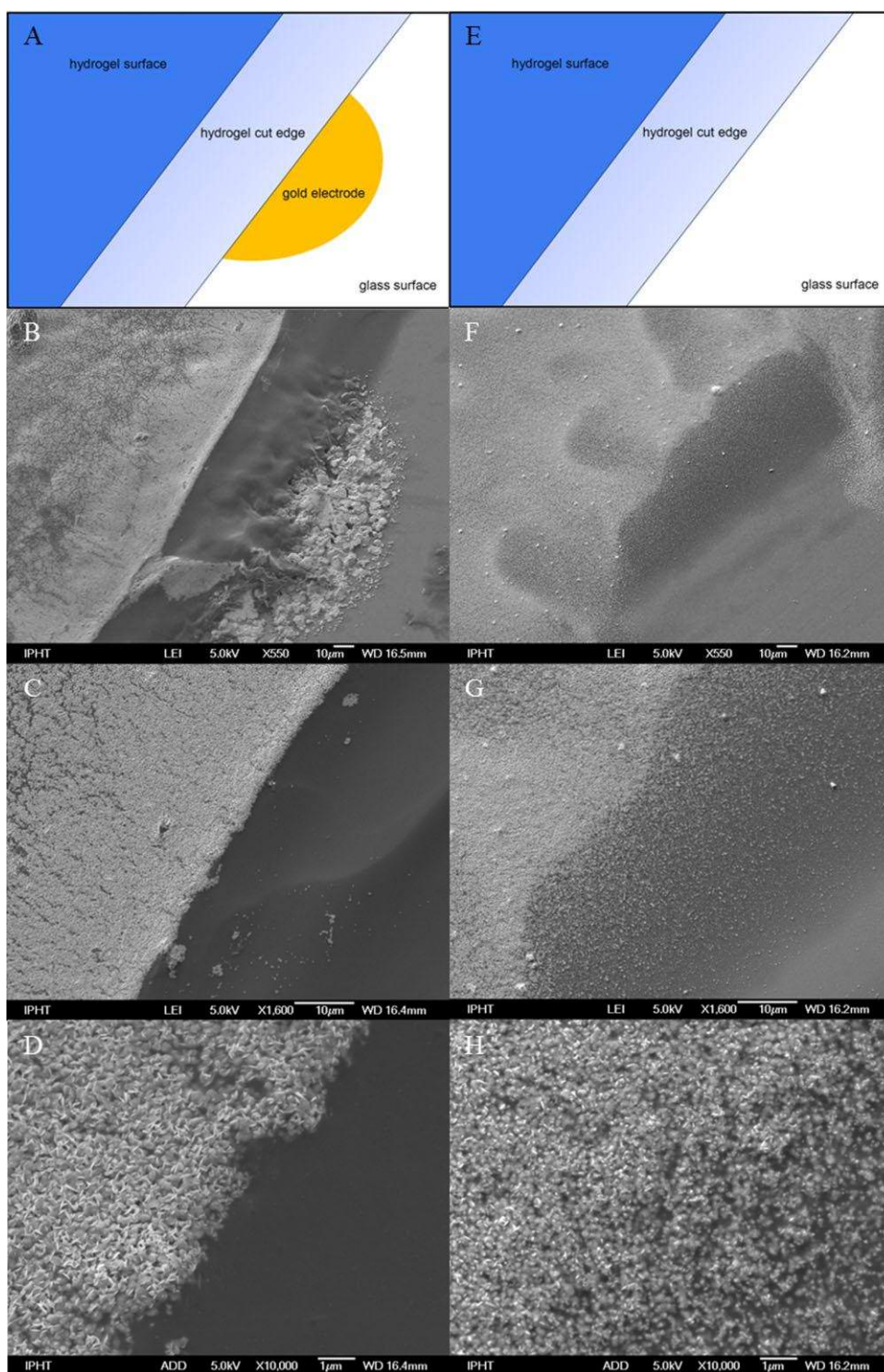


Figure 5. A,E) Scheme to illustrate the cutting area to examine whether the nanoparticle deposition is only on the hydrogel surface or in the whole volume. B–D) SEM images of hydrogel spots with the crosslinker *N,N*-methylenebisacrylamide show only silver deposition on hydrogel the surface of the F–H) SEM images of hydrogel spots with the crosslinker bis(acrylamidopropyl)PEG<sub>1900</sub> show deposition inside the hydrogel.

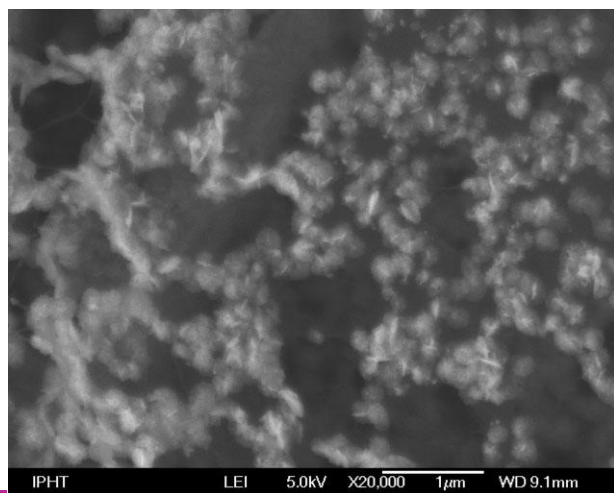


Figure 6. SEM image (20 000x magnification) of silver nanoparticles inside hydrogel (crosslinker bis(acrylamidopropyl) PEG1900).

assay's specificity was accomplished by a combination of tunable pore-formation and capture DNA regulated signal generation.

We also investigated the different concentrations of target-DNA for our hydrogel-microarray. To that goal, a final concentration of 1  $\mu\text{M}$  capture  $\text{NH}_2$ -/ $\text{SH}$ -oligonucleotides was immobilized in the hydrogel spots. Subsequently, biotin-labeled complementary target DNA in varying concentrations from 1  $\mu\text{M}$  to 0.39 nM was allowed to diffuse into the hydrogel. The deposition of silver nanoparticles monitored in-gel DNA-hybridization as well as attachment of streptavidin-horseradish-peroxidase. An intensification of the black gel color and accordingly an increase of the corresponding gray value was detectable for both immobilized

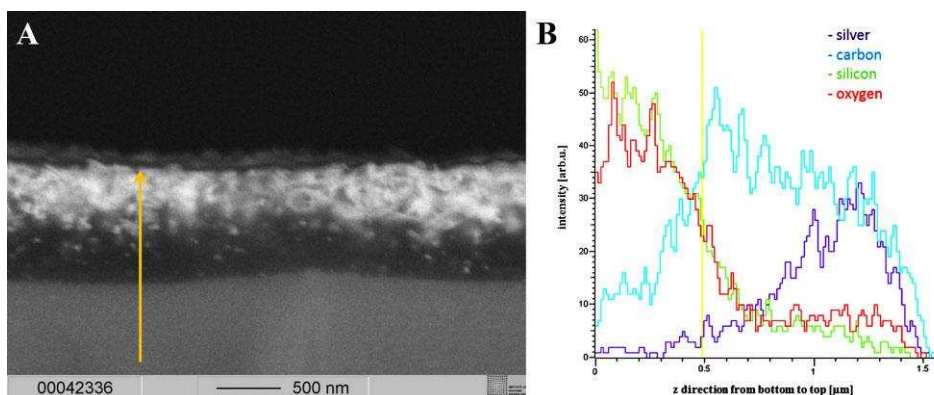


Figure 7. A) Cryogenic cutting of the substrate (z-direction, yellow arrow shows the scanning line for the EDX measurements). Starting from the bottom, the glass appears in gray, followed by the hydrogel layer in a darker gray, including dots and growing areas of white silver. The black colored zone represents the air above the hydrogel. B) EDX spectrum following the z-direction of the yellow arrow (A) from bottom to top. Intensity signals for the elementary analysis of silver, carbon, silicon, and oxygen are shown. The yellow line within the diagram represents the transition from glass to hydrogel.

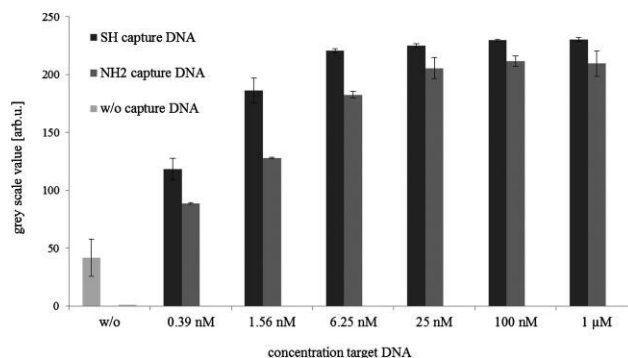


Figure 8. Quantification of signal intensities obtained in hydrogel spots. Error bars indicate spot-to-spot variations.

capture DNA moieties with increasing target DNA amount in the hybridizing solution (Figure 8). Additionally, the signals for  $\text{SH}$ -modified capture DNA were consistently higher (Figure 8,4C). This is in accordance with the stronger nucleophilicity of the thiolated DNA and the rapid reaction of  $\text{SH}$ -groups with double bonds known from the literature as thiol-ene click reaction.<sup>[39,47–50]</sup> Regarding the blank (w/o; hydrogel without capture DNA) the limit of detection was set to approximately 390 pM of target DNA without additional reductive silver deposition. Due to the increased reaction surface that enables the tacking of DNA interactions by precipitating nanoparticles within a hydrogel, the gray values reached a maximum already at 6.25 nM of target DNA. A comparison with an assay that also used nanoparticles for detection revealed roughly matchable sensitivities: limit-of-detection 0.1 nM for gold nanoparticles or 1  $\mu\text{M}$  after additional reductive silver deposition enhancement.<sup>[16]</sup> Due to the fact that our hydrogel spots are in the size of approximately 60  $\mu\text{m}$ , only small amounts of target DNA solutions are needed. It should be mentioned

that the fixed hydrogel spots on planar glass provide a surface for a convenient operating with several washing and incubation steps. Results of Rubina et al.<sup>[21]</sup> concerning the uniform diffusion and hybridization of up to 500 nucleotide long DNA molecules into the hydrogel volume seem to point out that the use of longer target nucleic acids is feasible. For example, ribosomal RNA/DNA fragments for the verification of bacterial infection or likewise viral DNA/ RNA molecules could be implemented in such a bioassay. Moreover, the analytical hydrogel platform could be adapted for the detection of a variety of peptides and proteins.

One has to consider that our novel hydrogel-microarrays open the possibility for implementation in on-site or point-of-care detection devices. The miniaturized array format seems to be combinable with microfluidic devices

that allow a multiplexed analysis of different nucleic acid solutions.<sup>[26,32]</sup> Future experiments should address the feasibility to set hydrogel plugs into microchannels, which was already tested by some groups with different gel compositions.<sup>[26–28,51]</sup> Another interesting approach could be the testing of hydrogel-associated nucleic acid amplification for further signal enhancement.<sup>[17,52]</sup>

#### 4. Conclusion

DNA-microarrays have emerged as a promising toolbox for a myriad of bioanalytical applications, especially for the detection of bacterial, viral, or plant pathogens. A major limitation of common 2D arrays was the time consuming surface activation to create functional groups for the binding of DNA.<sup>[38]</sup> Within this contribution, we present a novel hydrogel fabrication method that allows one-step photo-polymerization concomitant with capture DNA immobilization in the whole gel spot volume. At the same time, the spots are immobilized on the glass surface. The applied photoinitiator lithium phenyl-2,4,6-trimethyl-benzoyl-phosphine<sup>[34]</sup> allows easy polymerization at day-light.<sup>[35]</sup> Taken together, the resulting hydrogel-micro-arrays were successfully tested as reaction scaffolds for naked eye nucleic acid analytics.

#### 5. Abbreviations

PEG (polyethylene glycol)  
RNA (ribonucleic acid)  
NH<sub>2</sub> (amine)  
SH (thiol)  
EGNP (enzymatically generated nanoparticle)  
PBST (phosphate buffered saline with TWEEN 20)  
SEM (scanning electron microscope)

Acknowledgements: “WachstumsKern BASIS – Bio Analytics and Surfaces for Integrations in System” within the framework “Innovative regionale WachstumsKerne”, financially supported by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) Germany and “JBCI 2.0” InnoProfile-Transfer, Unternehmen Region (BMBF) is gratefully acknowledged. The authors would like to thank Franka Jahn and Andrea Dellith for SEM imaging, the group of Thomas Henkel for synthesizing and providing the crosslinker bis-acrylamidopropyl-PEG<sub>1900</sub> and Katrin Kandra for assistance with microfabrication.

Received: October 25, 2013; Revised: December 17, 2013; Published online: February 3, 2014; DOI: 10.1002/mabi.201300487

Keywords: chip-based DNA analysis; daylight photo-polymerization; DNA immobilization; hydrogel; one-step polymerization

- [1] K. Albrecht, M. Moeller, J. Groll, in *Chemical Design of Responsive Microgels* (Eds: A. Pich, W. Richtering), Springer, Heidelberg 2010, p. 65.
- [2] A. S. Hoffman, *Adv. Drug Delivery Rev.* 2002, 54, 3.
- [3] G. C. Le Goff, L. J. Blum, C. A. Marquette, *Macromol. Biosci.* 2013, 13, 227.
- [4] D. Costa, A. J. M. Valente, M. Graca Miguel, J. Queiroz, *Macromol. Biosci.* 2012, 12, 1243.
- [5] C. Leiterer, B. Seise, I. Slowik, G. Broenstrup, R. Niepelt, K. Weber, C. Ronning, S. Christiansen, W. Fritzsche, *J. Biophotonics* 2013, 6, 143.
- [6] R. Marie, A. Kristensen, *J. Biophotonics* 2012, 5, 673.
- [7] D. Lai, G. D. Smith, S. Takayama, *J. Biophotonics* 2012, 5, 650.
- [8] D. R. Whelan, K. R. Bamberg, L. Puskar, D. McNaughton, B. R. Wood, *J. Biophotonics* 2012.
- [9] X. Guo, *J. Biophotonics* 2012, 5, 483.
- [10] I. Charlebois, C. Gravel, N. Arrad, M. Boissinot, M. G. Bergeron, M. Leclerc, *Macromol. Biosci.* 2013, 13, 717.
- [11] H. Bunemann, *Nucleic Acids Res.* 1982, 10, 7181.
- [12] D. Brennan, S. Dillmore, E. Moore, P. Galvin, *Sens. Actuators B-Chem.* 2009, 142, 383.
- [13] C. L. Feng, G. J. Vancso, H. Schoenherr, *Adv. Funct. Mater.* 2006, 16, 1306.
- [14] C. M. Soto, C. H. Patterson, P. T. Charles, B. D. Martin, M. S. Spector, *Biotechnol. Bioeng.* 2005, 92, 934.
- [15] A. J. Bonham, T. Neumann, M. Tirrell, N. O. Reich, *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, e94.
- [16] A. Baieissa, N. Dave, B. D. Smith, J. Liu, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2010, 2, 3594.
- [17] H. Huang, P. Xiao, Z. Qi, Y. Bu, W. Liu, G. Zhou, *Analyst* 2009, 134, 2434.
- [18] C. L. Lewis, C.-H. Choi, Y. Lin, C.-S. Lee, H. Yi, *Anal. Chem.* 2010, 82, 5851.
- [19] F. N. Rehman, M. Audeh, E. S. Abrams, P. W. Hammond, M. Kenney, T. C. Boles, *Nucleic Acids Res.* 1999, 27, 649.
- [20] J. Tang, P. Xiao, *Biosens. Bioelectron.* 2009, 24, 1817.
- [21] A. Y. Rubina, S. V. Pan'kov, E. I. Dementieva, D. N. Pen'kov, A. V. Butygin, V. A. Vasiliskov, A. V. Chudinov, A. L. Mikheikin, V. M. Mikhailovich, A. D. Mirzabekov, *Anal. Biochem.* 2004, 325, 92.
- [22] M. S. Rutowska, F. C. G. Gunning, F. Kivlehan, E. Moore, D. Brennan, P. Galvin, A. D. Ellis, *Meas. Sci. Technol.* 2010, 21, 094016.

- [23] T. Neumann, A. J. Bonham, G. Dame, B. Berchtold, T. Brandstetter, J. Ruehe, *Anal. Chem.* 2010, 82, 6124.
- [24] M. Rendl, A. Boenisch, A. Mader, K. Schuh, O. Prucker, T. Brandstetter, J. Ruehe, *Langmuir* 2011, 27, 6116.
- [25] A. Bromberg, E. C. Jensen, J. Kim, Y. K. Jung, R. A. Mathies, *Anal. Chem.* 2012, 84, 963.
- [26] J. Liu, D. Gao, H.-F. Li, J.-M. Lin, *Lab Chip* 2009, 9, 1301.
- [27] K. G. Olsen, D. J. Ross, M. J. Tarlov, *Anal. Chem.* 2002, 74, 1436.
- [28] R. A. Zangmeister, M. J. Tarlov, *Langmuir* 2003, 19, 6901.
- [29] P. Baptista, E. Pereira, P. Eaton, G. Doria, A. Miranda, I. Gomes, P. Quaresma, R. Franco, *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 391, 943.
- [30] G. Festag, T. Schueler, R. Moeller, A. Csaki, W. Fritzsche, *Nanotechnology* 2008, 19, 125303.
- [31] S. H. Radwan, H. M. E. Azzazy, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2009, 9, 511.
- [32] B. Seise, A. Brinker, R. Kretschmer, M. Schwarz, B. Rudolph, T. Kaulfuss, M. Urban, T. Henkel, J. Popp, R. Moeller, *Eng. Life Sci.* 2011, 11, 148.
- [33] S. Julich, M. Riedel, M. Kielpinski, M. Urban, R. Kretschmer, S. Wagner, W. Fritzsche, T. Henkel, R. Moeller, S. Werres, *Biosens. Bioelectron.* 2011, 26, 4070.
- [34] M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* 1992, 33, 3077.
- [35] T. Majima, W. Schnabel, W. Weber, *Makromol. Chem. -Macromol. Chem. Phys.* 1991, 192, 2307.
- [36] D. Freidank, 3D-DNA Chips: Surface Attached Functional Polymer Networks as Matrix for Nucleic Acid Microarrays, 2005, [http://www.freidok.uni-freiburg.de/volltexte/1885/pdf/Dissertation\\_DF.pdf](http://www.freidok.uni-freiburg.de/volltexte/1885/pdf/Dissertation_DF.pdf) (accessed: January 2014).
- [37] E. C. Friedberg, L. D. McDaniel, R. A. Schultz, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2004, 14, 5.
- [38] W. Yang, *Protein Sci.* 2011, 20, 1781.
- [39] T. Yang, M. Malkoch, A. Hult, *J. Polym. Sci. A-Polym. Chem.* 2013, 51, 363.
- [40] B. D. Fairbanks, M. P. Schwartz, C. N. Bowman, K. S. Anseth, *Biomaterials* 2009, 30, 6702.
- [41] A. Brinker, H. Schulze, T. Bachmann, R. Moeller, *Biosens. Bioelectron.* 2010, 26, 898.
- [42] T. Schueler, R. Kretschmer, S. Jessing, M. Urban, W. Fritzsche, R. Moeller, J. Popp, *Biosens. Bioelectron.* 2009, 25, 15.
- [43] N. Annabi, S. M. Mithieux, A. S. Weiss, F. Dehghani, *Biomaterials* 2010, 31, 1655.
- [44] R. Barbucci, G. Leone, J. Biomed. Mater. Res. B-Appl. Biomater. 2004, 68B, 117.
- [45] S. G. Levesque, R. M. Lim, M. S. Shoichet, *Biomaterials* 2005, 26, 7436.
- [46] S. Trupp, P. Hoffmann, T. Henkel, G. J. Mohr, *Org. Biomol. Chem.* 2008, 6, 4319.
- [47] K. Kempe, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Macromol. Rapid Commun.* 2011, 32, 1484.
- [48] K. Kempe, A. Krieg, C. R. Becer, U. S. Schubert, *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 176.
- [49] J. Vandenberg, K. Ranieri, T. Junkers, *Macromol. Chem. Phys.* 2012, 213, 2611.
- [50] Q. Zhang, G.-Z. Li, C. R. Becer, D. M. Haddleton, *Chem. Commun.* 2012, 48, 8063.
- [51] G. H. Seong, W. Zhan, R. M. Crooks, *Anal. Chem.* 2002, 74, 3372.
- [52] D. A. Khodakov, N. V. Zakharova, D. A. Gryadunov, F. P. Filatov, A. S. Zasedatelev, V. M. Mikhailovich, *Biotechniques* 2008, 44, 241.





### 2.3. Fast-track, one-step E. coli detection: a miniaturized hydrogel array permits specific direct PCR and DNA hybridization while amplification

[AB3]

Antje Beyer, Sibyll Pollok, Dana Cialla-May, Karina Weber, Jürgen Popp

Die Publikation ist eingereicht in Macromolecular Bioscience; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Erklärung zu den Eigenanteilen der Promovendin sowie der weiteren Koautoren an den Publikationen. Antje Beyer ist gleichberechtigter Autor mit Postdoc Dr. Sibyll Pollok.

[AB3]	Autor 1: Antje Beyer	Autor 2: Sibyll Pollok	Autor 3: Anne Rudloff	Autor 4: Dana Cialla- May	Autor 5: Karina Weber	Autor 6: Jürgen Popp
Konzeption des Forschungsansatzes	50%	50%				
Planung der Untersuchungen	40%	30%	30%			
Datenerhebung	65%		35%			
Datenanalyse und -Interpretation	50%	20%	20%	5%	5%	
Schreiben des Manuskripts	60%	35%				5%
Vorschlag Anrechnung Publikationsäquivalente	1					

# Fast-track, one-step *E. coli* detection: a miniaturized hydrogel array permits specific direct PCR and DNA hybridization while amplification

Antje Beyer<sup>1,2,3,#</sup>, Sibyll Pollok<sup>1,3,4,#</sup>, Anne Rudloff<sup>1,3</sup>, Dana Cialla-May<sup>1,2,3</sup>, Karina Weber<sup>1,2,3\*</sup> and Jürgen Popp<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Leibniz-Institute of Photonic Technology, Jenaer BioChip Initiative, Albert-Einstein-Strasse 9, 07745 Jena, Germany

<sup>2</sup>Friedrich Schiller University Jena, Institute of Physical Chemistry and Abbe Centre of Photonics, Helmholtzweg 4, 07743 Jena, Germany

<sup>3</sup>InfectoGnostics Forschungscampus Jena, Zentrum für Angewandte Forschung, Philosophenweg 7, 07743 Jena, Germany

<sup>4</sup>Ernst-Abbe-Hochschule Jena, University of Applied Sciences, Carl-Zeiss-Promenade 2, 07745 Jena, Germany

\*corresponding author:

Dr. Karina Weber

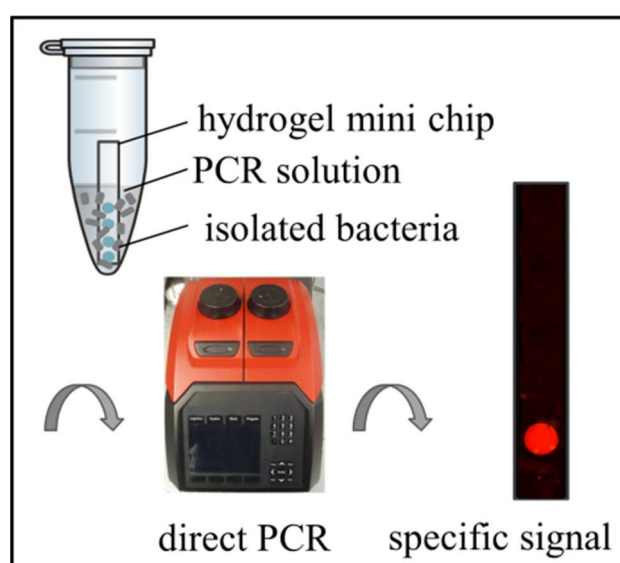
phone: +49 3641 206309/948390

fax: +49 3641 206399

email: [karina.weber@ipht-jena.de](mailto:karina.weber@ipht-jena.de)

#equal contribution

A timesaving and convenient method for bacterial detection based on one-step, one-tube DNA hybridization on hydrogel array while target gene amplification is described. The hydrogel array is generated by a fast one-pot synthesis, where N,N'-dimethylacrylamide/polyethyleneglycol(PEG<sub>1900</sub>)-bisacrylamide mixture polymerizes via radical photoinitiation by visible light within 20 minutes concomitant with *in situ* capture probe immobilization. These DNA-functionalized hydrogel droplets arrayed on a planar glass surface are placed in the PCR mixture during the thermal amplification cycles. The bacterial cells can be implemented in a direct PCR reaction, omitting the need for prior template DNA extraction. The resulting fluorescence signal is immediately detectable after the end of the PCR following one short washing step by microscopy. The performance of this novel hydrogel DNA array was successfully proven with varying cell numbers down to a limit of 10<sup>1</sup> *E. coli* cells.



# 1. Introduction

Hydrogels as crosslinked polymers form flexible porous matrices that swell in water and offer an increased surface area for functionalization compared to 2D surfaces. They possess an increased accessibility of gel-immobilized DNA molecules for hybridization compared to planar surfaces.<sup>[1]</sup> Various approaches of combining different sensor surfaces with 3D hydrogels for sensitive DNA detection were investigated, e.g. crystal fibers,<sup>[2]</sup> microfluidic channels,<sup>[3-5]</sup> and gold electrodes.<sup>[6]</sup> Hydrogels were also applied as DNA sensors in shape of microparticles,<sup>[7,8]</sup> or pads<sup>[9]</sup>. Since they are colorless and easily deformable, the handling of hydrogel particles exhibit some additional challenges. Therefore, immobilized arrayed spots<sup>[10,11]</sup> on planar surfaces remain the gold standard. However, the immobilization of hydrogels on such planar surfaces are also challenging. They originate in the swelling behavior of the network in all directions. Once they are fixed on a surface, they can only swell in two dimensions. Water exposition results in a confined swelling of the polymerized hydrogel, which is associated with surface perturbation already for thin films<sup>[12]</sup> and strong deformation of bulk gels<sup>[13]</sup>. For voluminous spots a complete rupture off the surface is observed. Moreover, the drying of aqueous drops containing dissolved matter on a solid surface leads to radial flow of liquid to the periphery where they form a so-called “coffee ring”.<sup>[14-16]</sup> This phenomenon account for increasing inhomogeneous spots. However, for automated high throughput readout, the spot morphology and uniformity is crucial.<sup>[17,18]</sup>

Highly sophisticated chemistry through molecular recognition between host hydrogels and guest glass substrates could be a solution for the adhesion of gels on a planar surface.<sup>[19]</sup> This on the other hand would lengthen the production, that is why, a fast and simple DNA hydrogel array generation comprise is feasible.

Moreover, within the context of past research, numerous strategies for DNA immobilization within the polymer network have been tested. Particularly, the chemical binding of functionalized oligonucleotides to pre-polymer groups or gel was performed.<sup>[4,20]</sup> Furthermore, the crosslinking units of the growing polymer are adapted for DNA functionalization to allow their immediate participation in the radical polymerization. A standard substituent is the methacrylic group of the phosphoramidite acrydite. This strategy ensures the immobilization of DNA during polymerization with acrylamide based gel mixtures.<sup>[8,9]</sup> Additionally, immobilization methods with amino-<sup>[11]</sup> and thiol-<sup>[21]</sup> modified DNA or thymine18-DNA<sup>[10,22]</sup> were ascertained.

The remaining challenge next to a rapid and simple hydrogel array generation is a time saving and easy-to-operate detection procedure. The in-gel immobilized DNA oligonucleotides (capture probes) have matching DNA sequences to the investigated target DNA. Thus, a positive hybridization event can be determined either by intercalating agents or target DNA labeling. The intercalation procedure is applied for quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR), where hybridization readout during amplification is possible. Moreover, hydrogels have been employed as longtime storage matrix for PCR reagents as well as component filter to identify pathogens already in whole blood.<sup>[23,24]</sup> In case of the labeling procedure, the target DNA is tagged while amplification. Afterwards, a hybridization step is carried out which requires adjustment of buffer conditions and additional time at suggested hybridization temperature. The significant reduction of detection time was investigated by combining PCR and readout. A 2D microarray in a tube lid was developed that included an

inner vessel with hybridization buffer, so that hybridization starts immediately after PCR turning the tube upside down.<sup>[25]</sup> This system allowed a signal detection without tube opening. Time for pipetting and handling is saved concomitant this lowering the contamination risk. Nevertheless, an additional hybridization time is obligatory. Other reports introduced hydrogels for multiplex qRT-PCR, wherein the primers are immobilized on the gel matrix.<sup>[26,27]</sup> This system refers as solid phase PCR and implies a reaction only on the surface of the hydrogels, since diffusion and functionality of the polymerase inside the gel is hindered. It was shown that only the polymer formed with the longer PEG1900BIS next to BIS allowed efficient enzyme diffusion and functionality inside the gel volume.<sup>[21]</sup>

To the best of our knowledge, a DNA hybridization during PCR amplification as a further time-saving mechanism has not been studied. Thus, a combination of fluid phase PCR while in gel hybridization was proceeded in one tube. A feasible approach would be the research towards on-site applications to solve environmental and medical questions. Therefore, the detection of bacteria from different media like synthetic urine would be practical.

We herein report a timesaving method for rapid and convenient bacteria detection using arrayed 3D hydrogel decorated chips. Important benefits of this approach are (a) the application of visible light for hydrogel generation<sup>[21]</sup>, (b) the adhesion of the hydrogel spots on glass surface without prior surface activation,<sup>[28]</sup> (c) their high uniform shape and size<sup>[28]</sup> and (d) the complete hydrogel volume accessibility for the DNA interaction. The high amount of glycerol in the pre-gel mixture<sup>[29]</sup> increases the porosity of the hydrogel network<sup>[30,31]</sup> and ensures an increased sensitivity compared to a 2D surface. Furthermore, a direct PCR with bacterial lysate containing the cellular debris accelerates the assay. Here, the hydrogel array, which is directly placed in the micro reaction tube, extracts the target DNA during the thermal amplification cycles by hybridization to the in-gel immobilized complementary DNA capture probes. Time for laborious DNA extraction and post-PCR hybridization is omitted. The signal readout is realized after a short washing step by fluorescence microscopy. With the bacterial detection from different media like synthetic urine, this research represents an important contribution in solving environmental and medical questions for on-site applications.

## 2. Experimental Section

### 2.1. Chemicals

DNA AWAY solution, Lysogeny Broth (LB) medium, 76 x 26 x 1 mm Microscopic glass slides, dimethylacrylamide, glycerol and ingredients for synthetic urine (CaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, KCl, Urea, Creatinine, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and NaCl) were purchased from Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany. Further, 0,5 mm thick glass slides (Heraeus Sensor Technology GmbH, 11 Hanau, Germany), photoinitiator lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (INNOVENT e.V., Jena, Germany), innuTaq DNA polymerase, dNTPs (Analytik Jena AG, Jena, Germany), GelRed™ (Biotium Inc., Hayward CA, USA), molecular weight markers GeneRuler 1 kb DNA ladder and GeneRuler 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig, Germany), lambda exonuclease (Roboklon GmbH, Berlin, Germany), Cy3.5 and phosphate modified primers

(Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Germany; **Table 1**) as well as acrydite-modified oligonucleotides (IDT Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium; Table 1) were purchased. All chemicals were employed without further purification.

*Table 1: Primers and capture probes*

DNA	Sequence 5'-3'	Modification
16S-com F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	5'-Cy3.5
16S-com R	ACGGCTACCTTGTACGACTT	5'-phosphate
16S-part F	GGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGG	5'-Cy3.5
16S-part R	CCCTACGGTTACCTTGTACGAC	5'-phosphate
Eco1	TTTTTTTTTTTTTTCAGCAAAGAGCAAGCTTCTTCCTGT	5'-acrydite <sup>1</sup>
Eco4	TTTTTTTTTTTTTGTGAATCACAAAGTGGTAAGCG	5'-acrydite <sup>1</sup>
NC	ACTGACTGACTGACTGACTGACTGGGCGGCGACCT	5'-acrydite <sup>1</sup>
E1	TTTTTTTTTTTTTTCAGCAAAGAGCAAGCTTCTTCCTGT	w/o <sup>2</sup>
E4	TTTTTTTTTTTTTGTGAATCACAAAGTGGTAAGCG	w/o <sup>2</sup>
NCb	TTTTTTTTTTTTTTACTGACTGACTGACTGACTGACTGGGCGGCGACCT	w/o <sup>2</sup>

<sup>1</sup> capture probes for 3D hydrogel; <sup>2</sup> capture probes for 2D surface

## 2.2. Bis-acrylamidopropyl-polyethylenglycol(PEG)<sub>1900</sub> synthesis

3.2 mmol (6.4 g) O,O'-bis(2-aminopropyl)PEG<sub>1900</sub> were solved in 20 ml dichloromethane (DCM) (20 ml). Thereafter 7.7 mmol (1 ml) freshly distilled triethylamine were added under an argon atmosphere and cooled to 0 °C. During continued stirring, 7 mmol (0.55 ml) acrylic acid chloride dissolved in 12 ml DCM were added dropwise. The formed hydrochloride was filtered after 60 min and the solvent distilled by a rotary evaporator. The leftover was washed 3 times with 30 ml methanol, dried under vacuum and stored at – 20 °C.<sup>[32]</sup>

## 2.3. 3D hydrogel array fabrication

The monomer solution contained 4% (w/v) N,N'-dimethylacrylamide, 0.6% (w/v) of the crosslinker bis-acrylamidopropyl-PEG<sub>1900</sub> and 60% glycerol (v/v) in distilled water.<sup>[21]</sup> The photoinitiator lithium phenyl-2,4,6-trimethyl-benzoyl-phosphinate<sup>[33]</sup> dissolved in H<sub>2</sub>O (0.5% w/v) was stored at 4 °C until use. The 0.5 mm thick glass substrate was cut into 1.2 x 12 mm pieces. These chips were successively cleaned in acetone, ethanol, and deionized water in an ultrasonic bath (BANDELIN electronic GmbH, Berlin, Germany). For the combined PCR approach the chips were additionally treated with DNA AWAY solution (VWR International, Darmstadt, Germany). The prepolymer solution consisted of 5 µl monomer solution, 0.75 µl of acrydite-modified capture probes (each hydrogel spot containing a different probe: Eco1, Eco4 or NC, 100 µM, Table 1) and 0.2 µl of the photoinitiator. Instantly after stirring, this mixture was spotted onto the chips (0.1 µl) employing a piezoelectric Nano-Plotter™ NP 2 (GeSiM, Grosserkmannsdorf, Germany). Then the spots were polymerized for 20 min via a laboratory lamp (Daylight Slimline Magnifying Lamp) in a distance of 2 cm to the glass surface. Afterwards, the chips were transferred into 0.2 ml PCR tubes (Starlab GmbH, Hamburg, Germany) and rinsed 5 min with sterile filtered 1x PBS buffer and 10 min with water.

#### 2.4. 2D array fabrication

For comparison experiments, 2D arrays with immobilized DNA on the surface were produced. To this end, 0.75 µl of poly-T-modified capture probes (E1, E4 or NCb, 100 µM, Table 1) were added to 5.2 µl 2x SSC buffer, spotted onto the glass chips by Nano-Plotter™ NP 2 and illuminated for 15 min with 254 nm UV light to immobilize the capture probes via radical binding of the thymine units to the glass surface.<sup>[34-36]</sup> Thereafter the chips were washed with 2x SSC and water for 2 min.

#### 2.5. Bacterial strains, growth, heat lysis and DNA extraction

*E. coli* (DSM-423, Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Culture, Braunschweig, Germany) were grown in LB medium (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) at 37°C with shaking at 250 rpm. The growth was monitored by determining the optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) using a biophotometer (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The bacterial cells were harvested at the exponential growth phase and cell numbers ( $1 \times 10^8$ - $10^1$ ) were calculated assuming that a OD<sub>600</sub> of 1 corresponds to  $8 \times 10^8$  cells/ml.<sup>[37]</sup> The cells were washed twice with 1x PBS, inoculated in synthetic urine<sup>[38]</sup> overnight and washed again with 1xPBS. After centrifugation the remaining cell sediment was dissolved in 5 µl nuclease-free water and applied directly into the PCR reaction mixture (direct PCR). For defined successive PCR approaches genomic DNA was isolated using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

#### 2.6. PCR

Amplification of a 1.5 kb (16S-com) and 100 bp (16S-part) fragment of the 16S ribosomal DNA (16S rDNA) region was carried out with primers listed in Table 1. The forward primer was labeled with a 5'-Cy3.5 and the reverse primer was 5'-phosphorylated to allow a subsequent lambda exonuclease treatment. The 50 µl PCR volume contained 0.25 µM forward/reverse primer in the case of symmetric approach or 0.25 µM forward primer and 0.025 µM reverse primer in the case of asymmetric approach, 1x PCR buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM dNTPs, 2.5 units innuTaq DNA polymerase and 4 ng genomic DNA in 5 µl nuclease-free water, 5 µl of the cleared bacterial lysate (direct PCR) or no template DNA (NTC = non template control). All PCR reactions were carried out with a thermocycler FlexCycler<sup>2</sup> (Analytik Jena AG, Jena, Germany). The PCR was performed with the following cycle profile: initial denaturation at 95°C for 180 sec, 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 52°C (1.5 kb fragment) or 54/56°C (100 bp fragment) for 30 sec, elongation at 72°C for 90 sec (1.5 kb fragment) or 30 sec (100 bp fragment) and a final elongation at 72°C for 10 min. Successful amplification was verified on a 1% (w/v) TAE agarose gel stained with GelRed™ (VWR International, Darmstadt, Germany) and molecular weight markers. For the generation of single-stranded DNA (ssDNA) 10 µl PCR product (symmetric amplification) was digested for 15 min at 37°C in 1x exonuclease buffer with 37.5 units of lambda exonuclease. Afterwards, the enzyme was inactivated by heat at 75°C for 10 min. 10 µl PCR product (symmetric amplification) was heat denatured for 10 min at 95°C and immediately placed on ice for 2 min.

### 2.7. In-gel hybridization after PCR and post-PCR processing (successive approach)

Single-stranded PCR product was mixed with hybridization buffer to obtain a final concentration of 3x SSC/ 0.5% SDS. The solution was pipetted onto the hydrogel array and incubated for 2 hours at 40°C (100 bp fragment) or overnight at 50°C (1.5 kb fragment). Due to the faster hybridization time of the short PCR product, further experiments were performed only with this fragment.

### 2.8. In-gel hybridization while PCR and post-PCR processing (combined approach)

A hydrogel chip was placed in the PCR reaction mix and amplification was performed as described. In case of working with whole bacteria, the pellet was taken up in 5 µl nuclease-free water and pipetted directly to the PCR master mix and the cells were disrupted by the first denaturation step (5 min at 95°C). For post-PCR processing, which resulted in generation of single-stranded target DNA, a final heat denaturation after the PCR approach was applied for 10 min at 95°C in the cycler. Afterwards the tubes were placed shortly on ice and incubated for 18 min at room temperature. The chips were then transferred in 2x SSC buffer and investigated by fluorescence microscopy.

### 2.9. Microscopic measurements

The fluorescence signals were recorded by a Zeiss Microscope Axio Imager.Z1 and HBO 100W lamp (Carl Zeiss, Jena, Germany). The images were analyzed by grey value scaling (Program Image J) and the brightness ratio of the fluorescence measured on the hydrogel droplets compared to the background was calculated. Confocal microscopic analysis was carried out with a Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Jena, Germany). A laser excitation at 543 nm was utilized for Cy3.5-labeled DNA. The images were processed using the associated software of Zeiss.

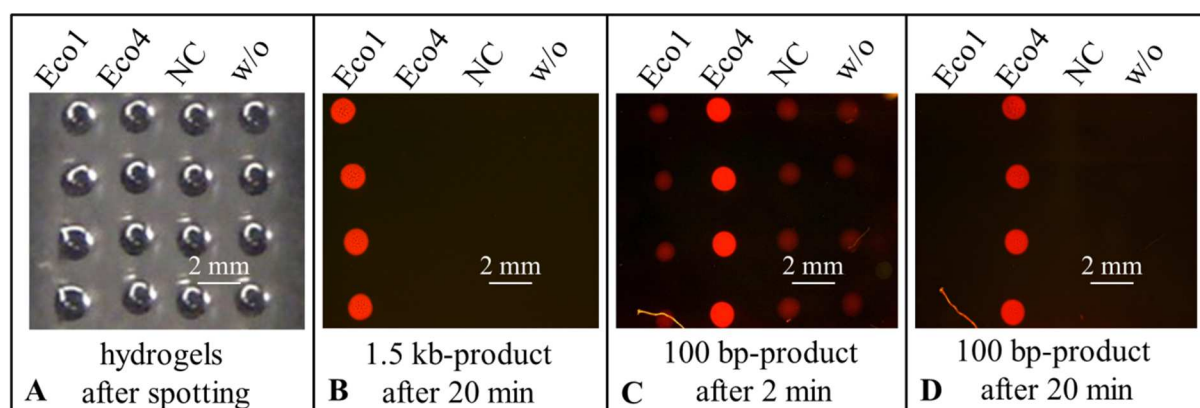
## 3. Results and Discussion

### 3.1. Hydrogels as reaction matrix for DNA analysis

An approach for simple and rapid hydrogel array generation was developed. Hydrogel droplets were spotted on planar glass surface and *in situ* spot fixation was realized simultaneously within 20 min polymerization time. Acrylamide polymers possess strong adhesive properties to glass and metal and are therefore part of a wide range of adhesive composites. A high amount of glycerol, which is not participating in the polymerization process, was present in the pre-polymer mixture. It prevents evaporation, which is a critical parameter for creation miniaturized spot arrays. The 0.1 µl spot volumes dry within less than 1 minute. Therefore the “coffee ring” shape would be the result. The glycerol prevents the spots from drying during gel formation and convex gel spots with high spot uniformity (**Figure 1A**) could be created. In case of glycerol absence during the drying process, the monomer/crosslinker concentration increases drastically before or during polymerization, which would result in lower gel porosity. In our approach the glycerol is later replaced by water without major spot volume changes. This greatly reduces the swelling forces so that the link between gel and surface remain stable and the hydrogels stay immobilized. Additionally, the supplemented glycerol increases the porosity of the hydrogel

network and ensures fast diffusion for the DNA macromolecules.<sup>[21]</sup> Furthermore, no additional time- or cost-intensive surface activation processes are needed to create robust immobilized hydrogels that withstand numerous washing steps.

A crucial factor to simplify the hydrogel array fabrication is the DNA capture probe immobilization in the gel matrix. Since the polymerized gels hinder diffusion and reactions inside the gel volume, a convenient one-step procedure for polymerization, functionalization and immobilization on the surface is highly desirable. The presented hydrogel preparation method fulfill these requisites, allowing for a gel-functionalization with DNA capture probes in parallel with hydrogel array production<sup>[21]</sup> in 20 min. Two sequences of the 16S rDNA region (Eco1, Eco4, Table 1) were chosen for the *E. coli* specific detection. In-gel immobilization of these capture probes, that are complementary to sequence parts of PCR products (Eco1 complementary to 1.5 kb fragment, Eco4 complementary to 100 bp fragment) and a non-complementary capture probe (NC) was realized. Acrydite-modified capture probes enabled the formation of gels twice as fast as amine- and thiol-modified probes<sup>[21]</sup>. Here the comparably chemistry of polymerization and immobilization of acrylamide units favors the reaction.



**Figure 1.** Specific fluorescence signals of hydrogel droplets after successive target DNA amplification followed by in-gel hybridization. A: bright field image of a 4x4 hydrogel array after spotting; B: fluorescence image of hybridized 1.5 kb-PCR product to gel-immobilized complementary Eco1 probe after 20 min washing; C: fluorescence image of hybridized 100 bp-PCR product to gel-immobilized complementary Eco4 probe after 2 min of washing; D: after ongoing washing of 20 min no unspecific signal could be observed. NC: immobilized non-complementary capture probe; w/o: hydrogel without capture probes.

### 3.2. Successive approach for in-gel hybridization after DNA amplification from extracted gDNA

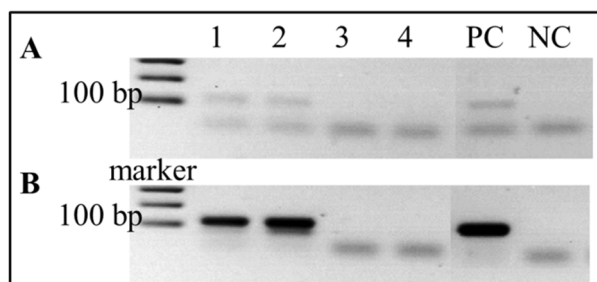
The standard procedure for DNA analysis via hydrogels includes successive steps: (a) isolation of gDNA from the investigated bacteria, (b) amplification of DNA sequence by thermal PCR and (c) adjustment of hybridization conditions. Firstly, we investigated this successive approach to select the proper PCR and hybridization conditions. PCR was performed with extracted *E. coli* gDNA as a template to amplify Cy3.5-labeled target DNA. Thereafter, single-stranded target DNA was generated by subsequent lambda exonuclease digestion and in-gel hybridization was conducted. Figure 1A shows a bright field image of a hydrogel array after spotting. The next image (Figure 1B) depicts the specific fluorescence signal after hybridization



with 1.5 kb target DNA fragment, which is complementary to the Eco1 capture probe. The Figures 1C and 1D show the specific hybridization of the 100 bp DNA fragment to the Eco4 capture probe after different washing times. It is evident that already after 2 min washing the specific signal is detectable. After a prolonged 20 min wash period all residual unbound target DNA and therefore all unspecific signal is removed. It has to be noted that the 1.5 kb amplicon also harbors the Eco4 complementary sequence but the DNA-DNA interaction favors the dangling of the hybridized amplicon towards the hydrogel surrounding.

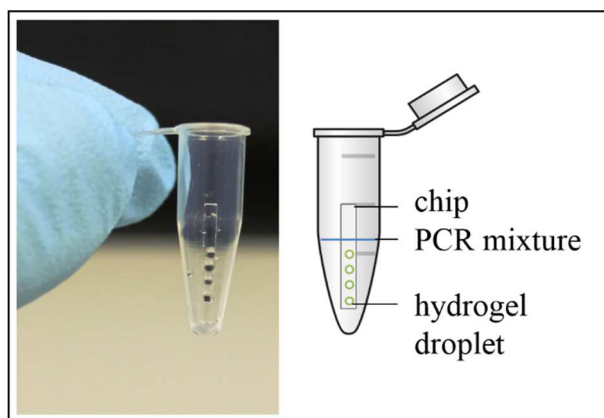
### 3.3. Combined approach for in-gel hybridization during DNA amplification from cleared bacterial lysate

The aim of combining in-gel DNA hybridization while DNA amplification by PCR was to allow an easy-to-operate workflow. Additionally, less equipment, pipetting steps and significant reduction of incubation time is realized. Moreover, the beneficial application of 3D hydrogels as a DNA detection interface compared to 2D surfaces is depicted. Thus, glass chips with surface-bound capture probes next to our hydrogel array were fabricated. After running the combined approach to amplify the 100 bp 16S rDNA fragment by PCR from cleared bacterial lysate (direct PCR without prior gDNA extraction) while in-gel hybridization, we investigated the PCR performance with microtubes containing 2D and 3D hydrogel chips for asymmetric and symmetric amplification. In **Figure 2** agarose gels illustrate that the presence of chips in the PCR mixture did not interfere with the correct fragment amplification.



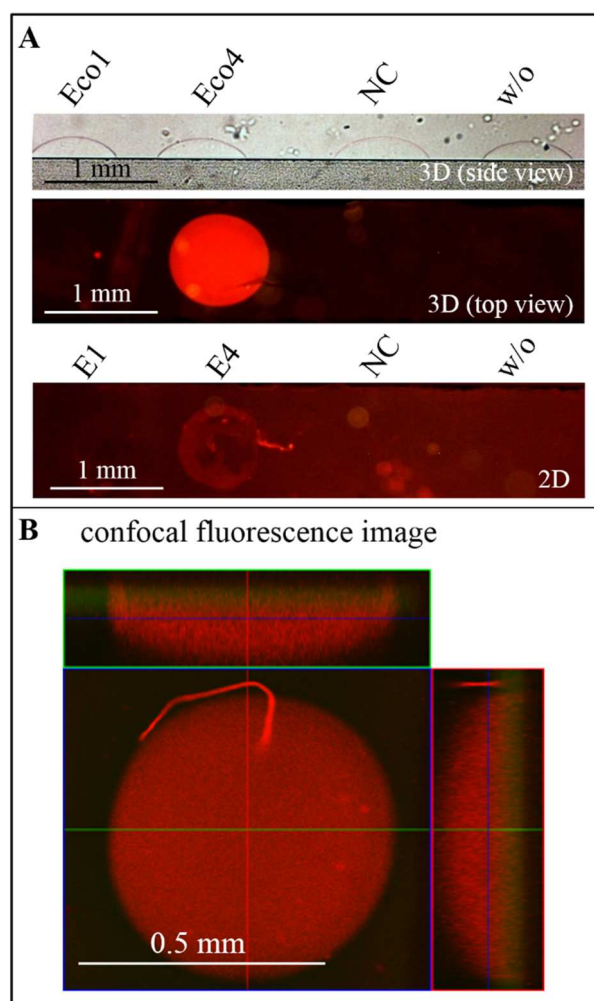
*Figure 2.* Analytical agarose gel to compare the amplification performance with and without chips for combined asymmetric (A) and symmetric PCR (B) of the 100 bp-fragment. 1: 2D chip included in PCR, 2: 3D chip included in PCR, 3: 2D chip negative control, 4: 3D chip negative control, PC: PCR positive control, NC: PCR negative control. The bands below the 100 bp marker represents residual primers.

The resulting amplicons in case of chip presence (Figure 2, line 1, 2) or absence (Figure 2, line 5) during PCR were of comparable strength. Moreover, the rapid direct PCR method that omit a prior gDNA extraction is working well with our protocol. **Figure 3** depicts the micro reaction tube with the included hydrogel array within the PCR mixture. After filling with 50  $\mu$ l PCR solution, all spots are immersed and ready for in-gel hybridization during thermal amplification.



*Figure 3.* Combined approach allowing specific DNA hybridization inside the hydrogel while thermal PCR cycles. The hydrogel array is placed directly in the PCR mixture in a common 0,2 ml micro reaction tube.

We found, that after conducting the combined asymmetric PCR approach the fluorescence signals for the 3D hydrogel chips were stronger than for the 2D chips (**Figure 4A**). This is explainable by the retarded diffusion of ssDNA within the hydrogel network compared to a surface during the heating cycles of the PCR process. Therefore the target DNA strands stay in closer vicinity to the capture probes in case of the hydrogel and can hybridize/re-hybridize faster than the migrated ones in case of the flat 2D surface. The confocal scan image in Figure 4B of the Eco4 signal shows fluorescence uniformly throughout the gel volume and reveals the accessibility of the target DNA to the whole volume of the spot. We want to point out that the in-gel hybridization while DNA amplification is a specific process, illustrated by the absence of unspecific fluorescence signals for non-complementary capture probes. Of note, no buffer change is necessary to adapt the hybridization conditions.

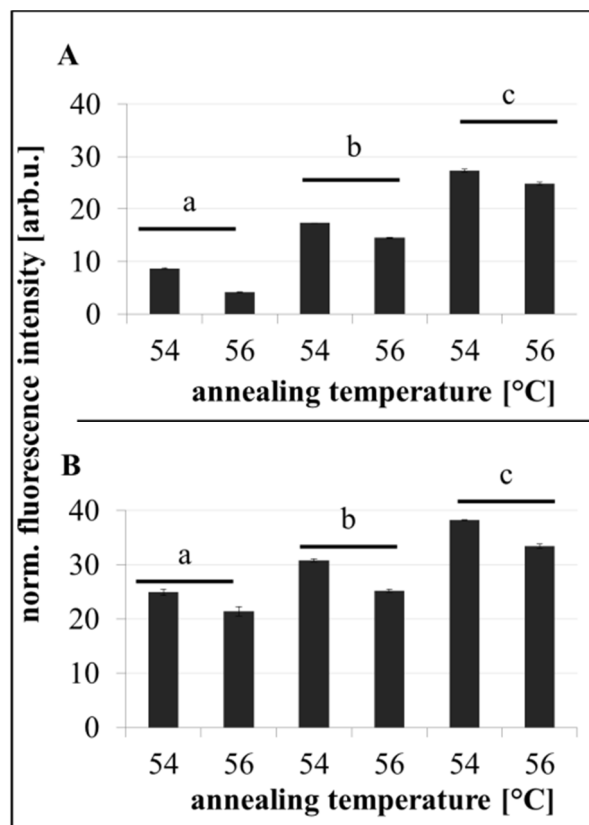


**Figure 4.** Generation of specific fluorescence signals for one-tube DNA hybridization during amplification approach. A: In the bright field image, a side view of the hydrogels is displayed (top picture). The fluorescence signals for hybridization of 3D (middle picture) and 2D (bottom picture) immobilized capture probes with the 100 bp-PCR product are also presented.

B: A confocal scan of a hydrogel droplet with positive hybridization signal depicting the homogeneous distribution of the fluorescence signal throughout the entire hydrogel volume.

In a next step, the PCR annealing temperature and gDNA amounts were varied to ensure the optimal fluorescence signal intensity for the combined asymmetric/symmetric PCR (**Figure 5A/B**). A higher signal appeared with lowering the annealing temperature (54°C) and a higher gDNA amount. We suggest therefore a combination of 54°C PCR annealing temperature with the mediate gDNA amount of 12 ng for a 50 µl PCR reaction.

The presence of single stranded DNA (ssDNA) is essential for the hybridization reaction. It can be generated after the PCR by heat denaturation at 95°C or an enzymatic digestion of the unlabeled strand. An asymmetric PCR enables the generation of ssDNA during the amplification process by using a primer in excess.



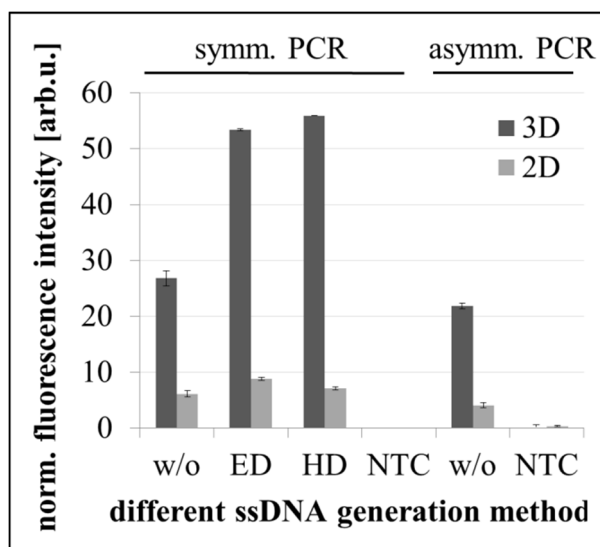
*Figure 5.* Fluorescence intensities for different PCR annealing temperatures and gDNA concentration (a = 4, b = 12, c = 24 ng gDNA) of an asymmetric combined protocol (A) and a symmetric combined protocol (B) for amplification of the 100 bp-PCR product.

Surprisingly, the procedure for symmetric PCR matched the results of the asymmetric approach, even though the first one yields primarily double-stranded products (Figure 5). The appearance of signals with the symmetric amplification is explainable by melting the DNA double strands during the 95°C steps of the repeated PCR cycles. Short 100 bp double- or single-stranded PCR products can diffuse into the hydrogel spots. During every denaturation step ssDNA is formed and whilst the following annealing steps a competitive hybridization of the target DNA takes place between binding to the gel immobilized capture probes or the complementary strands in solution. With every complete PCR cycle more target DNA can be enriched into the gel volume. Additionally, the signals for the symmetric PCR are higher (figure 5B), since the amplification of the DNA template progresses exponentially, while the asymmetric amplification proceeds only linearly after the limiting primer is used up.<sup>[39]</sup>

### 3.4. Optimization of 3D hydrogel array performing the combined approach

The hydrogel array exhibit a novel possibility of accumulating specific hybridization signals during symmetric PCR. A further performance optimization was conducted by various single stranded DNA generation methods after the PCR. For symmetric PCR the fluorescence signal was recorded without post-PCR processing, with exonuclease digestion (ED) and heat denaturation (HD). For the asymmetric PCR no additional treatment was applied (**Figure 6**). In all cases, the fluorescence signals for 3D hydrogels were higher than for 2D surfaces. The best

results were obtained by in-gel hybridization while symmetric PCR. Since the asymmetric PCR uses an uneven primer ratio, the received signal is lower than for the symmetric approach.

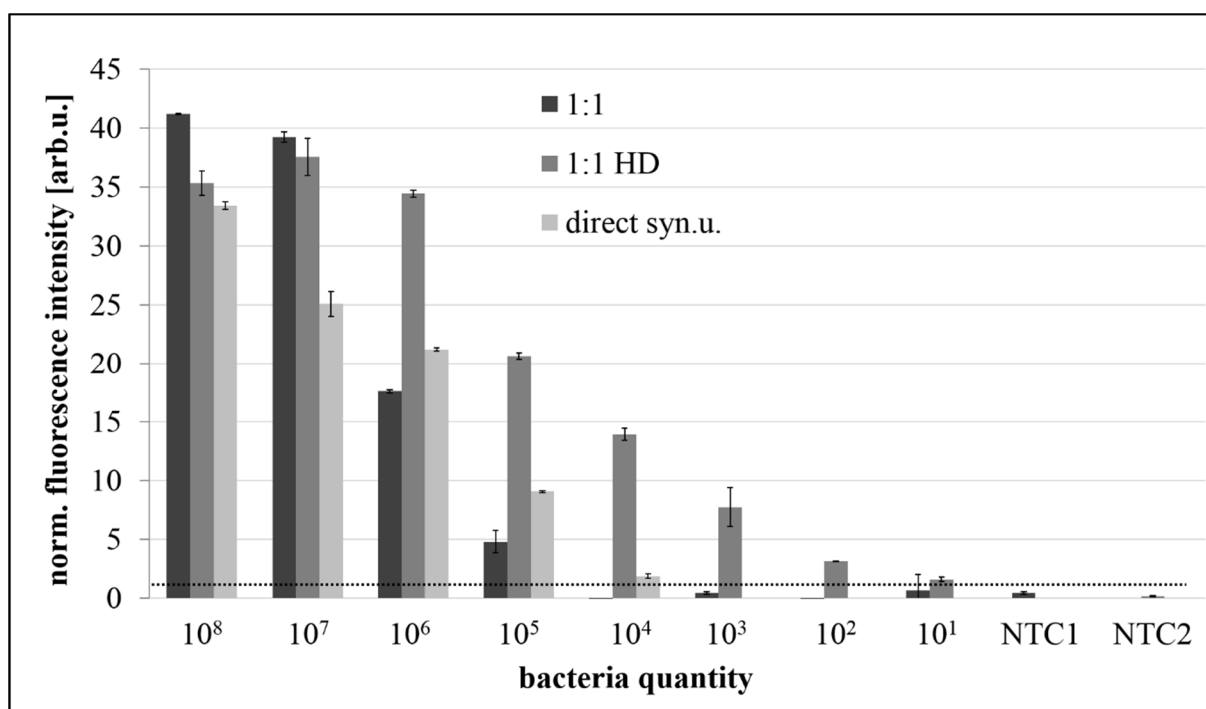


*Figure 6.* Comparison of various single stranded DNA generation methods. 2D and 3D signal outcome shown for symmetric PCR, exonuclease digestion (ED) and heat denaturation (HD) processed after symmetric and asymmetric PCR of the 100 bp-PCR product. The corresponding PCR negative control (NTC) are also depicted.

For the symmetric PCR a further signal increase was realizable with lambda exonuclease digestion or heat denaturation, which extended the protocol for tolerable 20 min. Since the enzymatic digestion of the non-complementary phosphorylated DNA strand requires additional reagent pipetting and handling, heat denaturation was selected for further experiments. A final heat denaturation step is easily implementable after the thermal PCR program.

### 3.5. Combined approach working with whole bacterial lysate including cellular debris

In general, time and operating steps are needed for bacterial lysis and template DNA isolation. Since the introduced hydrogel array also serve as a porous filter, allowing only certain molecule sizes for diffusion, the combined approach for hybridization while DNA amplification was tested with bacterial cells. Defining amounts of *E. coli* cell sediments ( $1 \times 10^8$ -  $1 \times 10^1$ ) isolated from artificial urine were resuspended in 5  $\mu$ l water and added directly to the PCR mixture. The initial heating step of 95°C in the thermocycler resulted in a cell rupture, releasing the bacterial macromolecules including the gDNA in the aqueous solution. The bacterial debris remained also in the tube during symmetric PCR. As shown in **Figure 7** the fluorescence signals were more intense for post-PCR heat denaturation of target DNA strands. Because of the uncertainty of diluting a solution to only one *E. coli*, we used ten bacteria for the smallest amount. The performance of our hydrogel array was successfully proven with varying cell numbers down to a limit of  $10^1$  *E. coli* with the set threshold of triple NTC standard variation. Note, that the presence of bacterial debris did not hinder the successful amplification and hybridization in the hydrogel.



*Figure 7.* Fluorescence signals (Eco4 capture probe) of combined direct PCR (*E. coli* incubated in synthetic urine, amplification of 100 bp-PCR product) for different bacterial quantities. A comparison of fluorescence signals is depicted for the combined approach (symmetric PCR), the combined approach with subsequent heat denaturation (symmetric PCR + HD) and a symmetric PCR with heat denaturation, where the bacterial cells are dispersed in synthetic urine and added directly to the PCR mixture. With a threshold of triple standard deviation of the negative control (NTC1: PCR without template) a detection of ten *E. coli* was realizable. No unspecific amplification of *B. subtilis* (NTC2: *B. subtilis* in concentration of 10<sup>8</sup> bacterial cells) could be observed.

#### 4. Conclusions

Within this contribution we present a rapid, easy-to-operate and cost efficient assay for *E. coli* detection applying hydrogel arrays for one-tube in-gel hybridization while PCR amplification of target gene. Accumulating specific fluorescence hybridization signals already during the various heating and cooling steps of the thermal PCR amplification features the reliable performance of the novel hydrogel tool for DNA analysis. No prior gDNA isolation, liquid handling in terms of adjusting hybridization buffer conditions and post-PCR time for hybridization is needed. The detection of only ten *E. coli* cells sedimented by centrifugation of synthetic urine was successfully achieved by direct PCR allowing the presence of bacterial debris, which does not hinder the amplification nor the hybridization event. Our study represents a further step towards optimizing hydrogels for DNA analysis in case of environmental or medical settings detecting bacteria.

## Abbreviations

DCM (DiChlorMethane)

DNA (DeoxyriboNucleic Acid)

LSM (Laser Scanning Microscopy)

PCR (Polymerase Chain Reaction)

PEG (PolyEthyleneGlycol)

PBS (Phosphate Buffered Saline)

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)

SEM (Scanning Electron Microscopy)

SSC (Saline-Sodium Citrate)

Acknowledgements: Funding of the research projects “Wachstums-kern BASIS – Bio Analytics and Surfaces for Integrations in System” (03WKCB01H) within the framework “Innovative regionale Wachstumskerne”, “JBCI 2.0” (03IPT513Y) within in the framework “InnoProfile-Transfer”, Unternehmen Region and “InfectoGnostics” (13GW0096F) by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF), Germany is gratefully acknowledged.

Keywords: one pot radical polymerization, functionalization of polymers, functional hydrogel interface, combined direct PCR

- [1] H. Bunemann, *Nucleic Acids Research* **1982**, *10*, 7181.
- [2] M. S. Rutowska, F. C. G. Gunning, F. Kivlehan, E. Moore, D. Brennan, P. Galvin, A. D. Ellis, *Measurement Science & Technology* **2010**, *21*.
- [3] R. L. Srinivas, S. D. Johnson, P. S. Doyle, *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 12099.
- [4] D. Brennan, S. Dillmore, E. Moore, P. Galvin, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2009**, *142*, 383.
- [5] A. Bromberg, E. C. Jensen, J. Kim, Y. K. Jung, R. A. Mathies, *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 963.
- [6] O. Y. F. Henry, S. Kirwan, A. M. Debela, C. K. O'Sullivan, *Electrochemistry Communications* **2011**, *13*, 1155.
- [7] N. W. Choi, J. Kim, S. C. Chapin, T. Duong, E. Donohue, P. Pandey, W. Broom, W. A. Hill, P. S. Doyle, *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 9370.
- [8] C. L. Lewis, C.-H. Choi, Y. Lin, C.-S. Lee, H. Yi, *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 5851.
- [9] A. Baeissa, N. Dave, B. D. Smith, J. Liu, *Acs Applied Materials & Interfaces* **2010**, *2*, 3594.
- [10] M. Rendl, A. Boenisch, A. Mader, K. Schuh, O. Prucker, T. Brandstetter, J. Ruehe, *Langmuir* **2011**, *27*, 6116.
- [11] A. Y. Rubina, S. V. Pan'kov, E. I. Dementieva, D. N. Pen'kov, A. V. Butygin, V. A. Vasiliskov, A. V. Chudinov, A. L. Mikheikin, V. M. Mikhailovich, A. D. Mirzabekov, *Analytical Biochemistry* **2004**, *325*, 92.
- [12] M. K. Kang, R. Huang, *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* **2010**, *58*, 1582.
- [13] Z. Xiao, M. Li, J. Zhou, *Acta Mechanica Solida Sinica* **2012**, *25*, 550.
- [14] R. D. Deegan, O. Bakajin, T. F. Dupont, G. Huber, S. R. Nagel, T. A. Witten, *Nature* **1997**, *389*, 827.
- [15] R. D. Deegan, *Phys. Rev. E* **2000**, *61*, 475.
- [16] R. D. Deegan, O. Bakajin, T. F. Dupont, G. Huber, S. R. Nagel, T. A. Witten, *Phys. Rev. E* **2000**, *62*, 756.
- [17] J. A. Rebhahn, C. Bishop, A. A. Divekar, K. Jiminez-Garcia, J. J. Kobie, F. Eun-Hyung, Lee, G. M. Maupin, J. E. Snyder-Cappione, D. M. Zais, T. R. Mosmann, *Computer Methods and Programms in Biomedicine* **2008**, *92*, 54.
- [18] M. Egmont-Petersena, D. de Ridderb, H. Handels, *Pattern Recognition* **2002**, *35*, 2279.
- [19] Y. Takashima, T. Sahara, T. Sekine, T. Kakuta, M. Nakahata, M. Otsubo, Y. Kobayashi, A. Harada, *Macromolecular Rapid Communications* **2014**, *35*, 1646.
- [20] A. J. Bonham, T. Neumann, M. Tirrell, N. O. Reich, *Nucleic Acids Research* **2009**, *37*.

- [21] A. Beyer, S. Pollok, A. Berg, K. Weber, J. Popp, *Macromolecular Bioscience* **2014**, 14, 889.
- [22] G. C. Le Goff, L. J. Blum, C. A. Marquette, *Macromolecular Bioscience* **2013**, 13, 227.
- [23] A. Atrazhev, D. P. Manage, A. J. Stickel, H. J. Crabtree, L. M. Pilarski, J. P. Acker, *Analytical Chemistry* **2010**, 82, 8079.
- [24] D. P. Manage, J. Lauzon, A. Atrazhev, X. Pang, L. M. Pilarski, *Lab on a Chip* **2013**, 13, 4011.
- [25] Q. Liu, Y. Bai, Q. Ge, S. Zhou, T. Wen, Z. Lu, *Clinical Chemistry* **2007**, 53, 188.
- [26] V. E. Barsky, A. M. Kolchinsky, Yu. P. Lysov, A. D. Mirzabekov, *Molecular Biology* **2002**, 36, 437.
- [27] D. A. Khodakov, N. V. Zakharova, D. A. Gryadunov, F. P. Filatov, A. S. Zasedatelev, V. M. Mikhailovich, *Biotechniques* **2008**, 44, 241.
- [28] A. Beyer, D. Cialla-May, K. Weber, J. Popp, [macp.201500439R1](#).
- [29] F. N. Rehman, M. Audeh, E. S. Abrams, P. W. Hammond, M. Kenney, T. C. Boles, *Nucleic Acids Research* **1999**, 27, 649.
- [30] S. G. Levesque, R. M. Lima, M. S. Shoichet, *Biomaterials* **2005**, 26, 7436.
- [31] D. Horák, Hlídková, J. Hradil, M. Lapčková, M. Šlouf, *Polymer* **2008**, 49, 2046.
- [32] M. Meldal, *Tetrahedron Letters* **1992**, 33, 3077.
- [33] T. Majima, W. Schnabel, W. Weber, *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **1991**, 192, 2307.
- [34] H. Gudnason, M. Dufva, D. D. Bang, A. Wolff, *BioTechniques* 2008, 45, 261.
- [35] T. Schüller, A. Nykytenko, A. Csaki, R. Möller, W. Fritzsche, J. Popp, *Analytical Bioanalytical Chemistry* 2009, 395, 1097.
- [36] Y. Sun, I. Perch-Nielsen, M. Dufva, D. Sabourin, D. D. Bang, J. Høgberg, A. Wolff, *Analytical Bioanalytical Chemistry* 2012, 402, 741.
- [37] T. Christensen, K. Trabbic-Carlson, W. Liu, A. Chilkoti, *Analytical Biochemistry* **2007**, 360 (1), 166.
- [38] Y. Yongmo, K. Sangpyeong, C. Junseok, *Journal of Microelectromechanical Systems* **2011**, 20, 819.
- [39] M. A. Innis, K. B. Myambo, D. H. Gelfand, M. A. D. Brow, *National Academy of Sciences* **1988**, 85 (24), 94.



### 3. Konferenzbeiträge

#### 3.1. Vorträge

##### 3.1.1. *Hydrogele für Chip-basierte DNS-Detektion*

Antje Beyer, Karina Weber, Jürgen Popp

2. Mitteldeutsches Chemiker Nachwuchstreffen; **Jena** 2012

##### 3.1.2. *3D-hydrogel-matrix for improved bioanalytical applications*

Antje Beyer, Karina Weber, Jürgen Popp

Polymeric and Selfassembled Hydrogels; **London** 2012

##### 3.1.3. *3D-Reaktionsmatrix für eine schnelle Bioanalytik*

Antje Beyer, Karina Weber, Jürgen Popp

16. Heiligenstädter Kolloquium; **Heilbad Heiligenstadt** 2012

##### 3.1.4. *3D-Hydrogele für DNS-Spurenanalytik mittels elektrisch-auslesbarem Mikrofluidik-Chip-System*

Antje Beyer, Sibyll Pollok, Karina Weber, Jürgen Popp

Anakon; **Essen** 2013

##### 3.1.5. *3D-hydrogel-matrix for improved bioanalytical applications*

Antje Beyer, Karina Weber, Jürgen Popp

European Symposium on Biomaterials and Related Areas; **Weimar** 2014

##### 3.1.6. *Biomedical Application of Hydrogel Chip Interfaces in DNA Detection*

Antje Beyer, Karina Weber, Jürgen Popp

ICMAT Hydrogels and Water-Soluble Polymers; **Singapur** 2013

##### 3.1.7. *Easy daylight polymerized hydrogel array for naked eye DNA-detection*

Antje Beyer, Sibyll Pollok, Albrecht Berg, Dana Cialla-May, Karina Weber, Jürgen Popp

European Symposium of Photopolymer Science; **Wien** 2014

### **3.1.8.** *Hydrogel Interface for DNA Test*

Antje Beyer, Sibyll Pollok, Albrecht Berg, Dana Cialla-May, Karina Weber, Jürgen Popp

17. Heiligenstädter Kolloquium; **Heilbad Heiligenstadt** 2014

## **3.2. Poster**

### **3.2.1.** *3D-surface on chips for electrical detection of DNA*

Antje Beyer, Ulrich Arnold, Karina Weber, Jürgen Popp

Photonics 4 Life; **Karlsruhe** 2011

### **3.2.2.** *Easy and fast chip-based detection of biomolecules*

Antje Beyer, Ulrich Arnold, Karina Weber, Jürgen Popp

Functional Genomics and Proteomics, DECHEMA; **Frankfurt am Main** 2012

#### **4. Abkürzungsverzeichnis**

BSA (Bovine Serum Albumin)

DNS (DesoxyriboNukleinSäure)

gDNS (genomische DesoxyriboNukleinSäure)

EDX (Energiedispersive Röntgenspektroskopie)

HRP (HorseRadish Peroxidase; Meerrettich Peroxidase)

PCR (Polymerase Chain Reaction)

PEG (PolyEthyleneGlycol)

REM (Raster Elektronen Mikroskopie)

RNS (RiboNukleinSäure)

SSC (Saline-Sodium Citrate)

## **5. Danksagung**

Spezieller Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Popp. Die vielfältigen Angebote der Weiterbildung durch Seminare, Vorträge und Teilnahme an zahlreichen Konferenzen erlaubten mir die Interaktion mit Wissenschaftlern aus aller Welt und fruchtbringende Diskussionen für meine Arbeit. Er ist ein zukunftsorientierter Leiter des Leibniz-Instituts für Photonische Technologien und ermöglichte mir dort eine professionelle und freundliche Arbeitsatmosphäre. Die Auflockerung durch viele soziale Mitarbeiterveranstaltungen aber auch die gewinnbringende Herausforderung in wissenschaftlichen Diskussionen bleiben mir in positiver Erinnerung.

Ebenso danke ich meinen direkten Vorgesetzten Dr. Karina Weber und Dr. Dana Cialla-May. Durch ihr tatkräftiges und ermutigendes Engagement und hilfreichen fachlichen Input in Sachen Projektmanagement und guter wissenschaftlicher Arbeitsweise, sind sie mir nicht nur Vorbilder sondern auch ein Grund für den Erfolg der vorliegenden Dissertation.

Weiter bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Sibyll Pollok, die mir als Postdoc beispiellos persönliche Unterstützung in der praktischen Arbeit und schnelle fachliche Zuarbeit für die Verfassung von Veröffentlichungen zukommen ließ.

Ein lieber Dank geht auch an meine Kollegen der Jenaer Biochip Initiative. Angefangen bei meiner konstanten Bürokollegin Christine Steinbach danke ich Dr. Lydia Schwenkbier, Martha Schwarz, Susanne Pahlow und Sabine Schmidt für gesellig motivierende Mittags- und Kaffee-Pausen. Darüber hinaus danke ich Sebastian Sailer, Robert Kretschmer, Dr. Frank Theil, Dr. Andreas Wolff, Werner Uhlemann, Konstantin Kirsch, Elmar Voigt, Martin Jahn, Izabella Hidi, Andreea Radu, Richard Knipper, Alexander Rieder und Vera Dugandzic für den inspirierenden persönlichen und fachlichen Austausch am IPHT.

Dank gebührt auch den Arbeitern im Reinraum (Franka Jahn, Andrea Dellith) für Oberflächenaktivierung und Elektronenmikroskopische und EDX-Aufnahmen.

Zuletzt geht der größte persönliche Dank an meinen liebevollen Ehemann Pastor Stefan Beyer, unsere herzliche Gemeinschaft in der Evangeliumsgemeinde Jena, meine Mutter und Vorbild Kerstin Koch, meine geliebten Großeltern Hartmut und Doris Koch und an alle lieben Freunde, die mich in diesem Lebensabschnitt begleitet haben.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] G. Mendel, *Verhandlungen des Naturforschenden Vereins zu Brünn* **1866**, 4, 3.
- [2] R. Altmann, "Über Nucleinsäuren", in *Physiologische Abteilung Leipzig, Archiv für Anatomie und Physiologie*, 1889, p. 524.
- [3] P. Levene, *Journal of Biological Chemistry* **1919**, 40, 415.
- [4] O. Avery, C. MacLeod, M. McCarty, *Journal of Experimental Medicine* **1944**, 79, 137.
- [5] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 964.
- [6] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737.
- [7] C. E. Hall, M. Litt, *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **1958**, 4, 1.
- [8] P. Doty, *Journal of cellular physiology. Supplement* **1957**, 49, 27.
- [9] L. Pauling, R. B. Corey, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1956**, 65, 164.
- [10] J. Marmur, P. Doty, *Nature* **1959**, 183, 1427.
- [11] J. Marmur, D. Lane, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1960**, 46, 453.
- [12] P. Doty, J. Marmur, J. Eigner, C. Schildkraut, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1960**, 46, 461.
- [13] J. Marmur, P. Doty, *Journal of Molecular Biology* **1961**, 3, 585.
- [14] E. Volkin, L. Astrachan, J. L. Countryman, *Virology* **1958**, 6, 545.
- [15] B. D. Hall, S. Spiegelman, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1961**, 47, 137.
- [16] G. T. Okita, J. J. Kabara, F. Richardson, G. V. Le Roy, *Nucleonics* **1957**, 15, 111.
- [17] A. P. Nygaard, B. D. Hall, *Journal of Molecular Biology* **1964**, 9, 125.
- [18] E. K. F. Bautz, B. D. Hall, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1962**, 48, 400.
- [19] E. T. Bolton, B. J. McCarthy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1962**, 48, 1390.
- [20] D. Gillespie, S. Spiegelman, *Journal of Molecular Biology* **1965**, 12, 829.
- [21] M. L. Pardue, J. G. Gall, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1969**, 64, 600.
- [22] K. W. Jones, Robertso.Fw, *Chromosoma* **1970**, 31, 331.
- [23] T. Ried, G. Landes, W. Dackowski, K. Klinger, D. C. Ward, *Human molecular genetics* **1992**, 1, 307.
- [24] A. Baldini, D. C. Ward, *Genomics* **1991**, 9, 770.
- [25] E. M. Southern, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2001**, 170, 1.
- [26] M. Grunstein, D. S. Hogness, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1975**, 72, 3961.
- [27] W. D. Benton, R. W. Davis, *Science* **1977**, 196, 180.
- [28] A. M. Maxam, W. Gilbert, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1977**, 74, 560.
- [29] S. N. Cohen, A. C. Y. Chang, H. W. Boyer, R. B. Helling, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1973**, 70, 3240.
- [30] A. C. Chinault, J. Carbon, *Gene* **1979**, 5, 111.
- [31] Merrifield, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **1969**, 32, 221.
- [32] R. L. Letsinger, J. L. Finnan, G. A. Heavner, W. B. Lunsford, *Journal of the American Chemical Society* **1975**, 97, 3278.
- [33] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Letters* **1981**, 22, 1859.
- [34] H. G. Khorana, H. Buchi, H. Ghosh, N. Gupta, T. M. Jacob, H. Kossel, R. Morgan, S. A. Narang, E. Ohtsuka, R. D. Wells, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **1966**, 31, 39.
- [35] N. S. Corby, G. W. Kenner, A. R. Todd, *Journal of the Chemical Society* **1952**, 3669.
- [36] R. B. Wallace, J. Shaffer, R. F. Murphy, J. Bonner, T. Hirose, K. Itakura, *Nucleic Acids Research* **1979**, 6, 3543.
- [37] F. C. Kafatos, C. W. Jones, A. Efstratiadis, *Nucleic Acids Research* **1979**, 7, 1541.

- [38] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1977**, 74, 5463.
- [39] F. Sanger, G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, J. C. Fiddes, C. A. Hutchison, P. M. Slocombe, M. Smith, *Nature* **1977**, 265, 687.
- [40] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim, *Science* **1985**, 230, 1350.
- [41] K. Kleppe, E. Ohtsuka, R. Kleppe, I. Molineux, H. G. Khorana, *Journal of Molecular Biology* **1971**, 56, 341.
- [42] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, *Science* **1988**, 239, 487.
- [43] F. C. Lawyer, S. Stoffel, R. K. Saiki, S. Y. Chang, P. A. Landre, R. D. Abramson, D. H. Gelfand, *PCR methods and applications* **1993**, 2, 275.
- [44] N. M. Green, *Biochimica Et Biophysica Acta* **1962**, 59, 244.
- [45] E. E. Snell, F. M. Strong, *INDUSTRIAL AND ENGINEERING CHEMISTRY* **1939**, 11, 346.
- [46] E. E. Snell, R. E. Eakin, R. J. Williams, *Journal of the American Chemical Society* **1940**, 61, 175.
- [47] E. Engvall, P. Perlmann, *Immunochemistry* **1971**, 8, 871.
- [48] Vanweeme.Bk, A. H. W. Schuurs, *Febs Letters* **1971**, 15, 232.
- [49] J. E. Manning, N. D. Hershey, T. R. Broker, M. Pellegrini, H. K. Mitchell, N. Davidson, *Chromosoma* **1975**, 53, 107.
- [50] T. R. Broker, L. M. Angerer, P. H. Yen, N. D. Hershey, N. Davidson, *Nucleic Acids Research* **1978**, 5, 363.
- [51] P. R. Langer, A. A. Waldrop, D. C. Ward, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **1981**, 78, 6633.
- [52] J. J. Leary, D. J. Brigati, D. C. Ward, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **1983**, 80, 4045.
- [53] J. D. Thompson, D. Gillespie, *Clinical Biochemistry* **1990**, 23, 261.
- [54] H. B. Gamper, G. D. Cimino, S. T. Isaacs, M. Ferguson, J. E. Hearst, *Nucleic Acids Research* **1986**, 14, 9943.
- [55] T. R. Gingeras, D. Y. Kwoh, G. R. Davis, *Nucleic Acids Research* **1987**, 15, 5373.
- [56] R. K. Saiki, P. S. Walsh, C. H. Levenson, H. A. Erlich, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, 86, 6230.
- [57] M. S. Urdea, J. A. Running, T. Horn, J. Clyne, L. Ku, B. D. Warner, *Gene* **1987**, 61, 253.
- [58] V. Lund, R. Schmid, D. Rickwood, E. Hornes, *Nucleic Acids Research* **1988**, 16, 10861.
- [59] P. J. Nicholls, A. D. B. Malcolm, *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **1989**, 3, 122.
- [60] D. Y. Kwoh, G. R. Davis, K. M. Whitfield, H. L. Chappelle, L. J. Dimichele, T. R. Gingeras, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, 86, 1173.
- [61] A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. G. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, P. G. Schultz, *Nature* **1996**, 382, 609.
- [62] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, 382, 607.
- [63] R. S. Matson, J. Rampal, S. L. Pentoney, P. D. Anderson, P. Coassin, *Analytical Biochemistry* **1995**, 224, 110.
- [64] S. Nagahara, T. Matsuda, *Polymer Gels and Networks* **1996**, 4, 111.
- [65] T. T. Nikiforov, R. B. Rendle, P. Goelet, Y. H. Rogers, M. L. Kotewicz, S. Anderson, G. L. Trainor, M. R. Knapp, *Nucleic Acids Research* **1994**, 22, 4167.
- [66] S. R. Rasmussen, M. R. Larsen, S. E. Rasmussen, *Analytical Biochemistry* **1991**, 198, 138.
- [67] D. Rekesh, Y. Lyubchenko, L. S. Shlyakhtenko, S. M. Lindsay, *Biophysical Journal* **1996**, 71, 1079.
- [68] E. M. Southern, *Journal of Molecular Biology* **1975**, 98, 503.
- [69] E. N. Timofeev, S. V. Kochetkova, A. D. Mirzabekov, V. L. Florentiev, *Nucleic Acids Research* **1996**, 24, 3142.
- [70] J. Vanness, S. Kalbfleisch, C. R. Petrie, M. W. Reed, J. C. Tabone, N. M. J. Vermeulen, *Nucleic Acids Research* **1991**, 19, 3345.
- [71] C. P. H. Vary, *Clinical Chemistry* **1992**, 38, 687.
- [72] N. Zammateo, C. Girardeaux, D. Delforge, J. J. Pireaux, J. Remacle, *Analytical Biochemistry* **1996**, 236, 85.
- [73] R. M. Zimmermann, E. C. Cox, *Nucleic Acids Research* **1994**, 22, 492.

- [74] E. Fahy, G. R. Davis, L. J. Dimichele, S. S. Ghosh, *Nucleic Acids Research* **1993**, *21*, 1819.
- [75] D. J. Arndtjovin, T. M. Jovin, W. Bahr, A. M. Frischauf, M. Marquardt, *European Journal of Biochemistry* **1975**, *54*, 411.
- [76] P. R. Langersafer, M. Levine, D. C. Ward, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **1982**, *79*, 4381.
- [77] S. G. Siddell, *European Journal of Biochemistry* **1978**, *92*, 621.
- [78] G. Yershov, V. Barsky, A. Belgovskiy, E. Kirillov, E. Kreindlin, I. Ivanov, S. Parinov, D. Guschin, A. Drobishev, S. Dubiley, A. Mirzabekov, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 4913.
- [79] H. Bunemann, *Nucleic Acids Research* **1982**, *10*, 7181.
- [80] H. Bunemann, P. Westhoff, R. G. Herrmann, *Nucleic Acids Research* **1982**, *10*, 7163.
- [81] F. N. Rehman, M. Audeh, E. S. Abrams, P. W. Hammond, M. Kenney, T. C. Boles, *Nucleic Acids Research* **1999**, *27*, 649.
- [82] B. G. Healey, R. S. Matson, D. R. Walt, *Analytical Biochemistry* **1997**, *251*, 270.
- [83] K. R. Khrapko, P. Lysov Yu, A. A. Khorlin, I. B. Ivanov, G. M. Yershov, S. K. Vasilenko, V. L. Florentiev, A. D. Mirzabekov, *DNA sequence : the journal of DNA sequencing and mapping* **1991**, *1*, 375.
- [84] J. K. Inman, *Methods in enzymology* **1974**, *34*, 30.
- [85] E. Maier, J. D. Hoheisel, L. McCarthy, R. Mott, A. V. Grigoriev, A. P. Monaco, Z. Larin, H. Lehrach, *Nature Genetics* **1992**, *1*, 273.
- [86] D. A. Zubtsov, E. N. Savvateeva, A. Y. Rubina, S. V. Pan'kov, E. V. Konovalova, O. V. Moiseeva, V. R. Chechetkin, A. S. Zasedatelev, *Analytical Biochemistry* **2007**, *368*, 205.
- [87] A. Baeissa, N. Dave, B. D. Smith, J. Liu, *Acs Applied Materials & Interfaces* **2010**, *2*, 3594.
- [88] H. Huang, P. Xiao, Z. Qi, Y. Bu, W. Liu, G. Zhou, *Analyst* **2009**, *134*, 2434.
- [89] C. L. Lewis, C.-H. Choi, Y. Lin, C.-S. Lee, H. Yi, *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 5851.
- [90] A. V. Vasiliskov, E. N. Timofeev, S. A. Surzhikov, A. L. Drobyshev, V. V. Shick, A. D. Mirzabekov, *Biotechniques* **1999**, *27*, 592.
- [91] Y. K. Jung, J. Kim, R. A. Mathies, *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 3165.
- [92] I. Khimji, E. Y. Kelly, Y. Helwa, M. Hoang, J. Liu, *Methods* **2013**, *64*, 292.
- [93] F. Kivlehan, M. Paolucci, D. Brennan, I. Ragoussis, P. Galvin, *Analytical Biochemistry* **2012**, *421*, 1.
- [94] A. Kolchinsky, A. Mirzabekov, *Human Mutation* **2002**, *19*, 343.
- [95] D.-S. Lee, J.-S. Park, E. J. Lee, H. J. Kim, J. Lee, *Analyst* **2013**, *138*, 4786.
- [96] J. Tang, P. Xiao, *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, *24*, 1817.
- [97] X. Xiong, C. Wu, C. Zhou, G. Zhu, Z. Chen, W. Tan, *Macromolecular Rapid Communications* **2013**, *34*, 1271.
- [98] G. Xia, W. Gao, K. Ji, S. Liu, B. Wan, J. Luo, Y. Bai, *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2011**, *7*, 807.
- [99] L. Cheng, Q. Ge, B. Sun, P. Yu, X. Ke, Z. Lu, *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2009**, *5*, 542.
- [100] L. Cheng, B. Sun, Y. Sun, P. Xiao, Q. Ge, Y. Zheng, X. Ke, Y. Zhou, M. Zhang, P. Chen, Z. Lu, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2010**, *10*, 479.
- [101] A. Y. Rubina, S. V. Pan'kov, E. I. Dementieva, D. N. Pen'kov, A. V. Butygin, V. A. Vasiliskov, A. V. Chudinov, A. L. Mikheikin, V. M. Mikhailovich, A. D. Mirzabekov, *Analytical Biochemistry* **2004**, *325*, 92.
- [102] *the chipping forecast II Nature Genetics* **2002**, *32*.
- [103] *The chipping forecast Nature Genetics* **1999**, *21*.
- [104] P. K. Sorger, *Nature Biotechnology* **2008**, *26*, 1345.
- [105] J. G. Gall, M. L. Pardue, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1969**, *63*, 378.
- [106] D. Huckle, *Expert Review of Medical Devices* **2006**, *3*, 421.
- [107] P. Marsh, D. L. N. Cardy, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2004**, *266*, 167.
- [108] J. Weile, C. Knabbe, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *394*, 731.
- [109] E. Andersson, C. M. Dahmcke, K. Steven, L. K. Larsen, P. Guldberg, *Plos One* **2015**, *10*.
- [110] S. A. Byrnes, J. D. Bishop, L. Lafleur, J. R. Buser, B. Lutz, P. Yager, *Lab on a Chip* **2015**, *15*, 2647.

- [111] A. G. Freifeld, K. A. Simonsen, C. S. Booth, X. Zhao, S. E. Whitney, T. Karre, P. C. Iwen, H. J. Viljoen, *Journal of Molecular Diagnostics* **2012**, *14*, 274.
- [112] J. R. Choi, R. Tang, S. Wang, W. A. B. W. Abas, B. Pingguan-Murphy, F. Xu, *Biosensors & Bioelectronics* **2015**, *74*, 427.
- [113] P. Daggumati, Z. Matharu, L. Wang, E. Seker, *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 8618.
- [114] Y. Mori, M. Kitao, N. Tomita, T. Notomi, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2004**, *59*, 145.
- [115] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase, *Nucleic Acids Research* **2000**, 28.
- [116] L. Schwenkbier, S. Pollok, A. Rudloff, S. Sailer, D. Cialla-May, K. Weber, J. Poppa, *Analyst* **2015**, *140*, 6610.
- [117] K. Hsieh, A. S. Patterson, B. S. Ferguson, K. W. Plaxco, H. T. Soh, *Angewandte Chemie-International Edition* **2012**, *51*, 4896.
- [118] H. Wang, W. Liu, X. Zhang, X. Xu, Z. Kang, S. Li, Z. Wu, Z. Yang, B. Yao, M. Guan, *Journal of Chromatography A* **2015**, *1410*, 28.
- [119] E. T. Lagally, C. A. Emrich, R. A. Mathies, *Lab on a Chip* **2001**, *1*, 102.
- [120] B. S. Ferguson, S. F. Buchsbaum, T.-T. Wu, K. Hsieh, Y. Xiao, R. Sun, H. T. Soh, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 9129.
- [121] J. H. Son, B. Cho, S. Hong, S. H. Lee, O. Hoxha, A. J. Haack, L. P. Lee, *Light-Science & Applications* **2015**, *4*.
- [122] J. Xu, B. Jiang, J. Xie, Y. Xiang, R. Yuan, Y. Chai, *Chemical Communications* **2012**, *48*, 10733.
- [123] J. Reichert, A. Csaki, J. M. Kohler, W. Fritzsche, *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 6025.
- [124] D. I. Stimpson, J. V. Hoijer, W. T. Hsieh, C. Jou, J. Gordon, T. Theriault, R. Gamble, J. D. Baldeschwieler, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92*, 6379.
- [125] T. A. Taton, G. Lu, C. A. Mirkin, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 5164.
- [126] T. A. Taton, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *Science* **2000**, *289*, 1757.
- [127] J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 1959.
- [128] S. J. Park, T. A. Taton, C. A. Mirkin, *Science* **2002**, *295*, 1503.
- [129] R. Tubbs, J. Pettay, D. Hicks, M. Skacel, R. Powell, T. Grogan, J. Hainfeld, *Journal of Molecular Histology* **2004**, *35*, 589.
- [130] R. D. Powell, V. N. Joshi, J. F. Hainfeld, K. Das, R. Launsbury, J. Pettay, R. R. Tubbs, R. Levenson, *Laboratory Investigation* **2006**, *86*, 333A.
- [131] R. D. Powell, V. N. Joshi, J. F. Hainfeld, K. Das, R. Lounsbury, J. Pettay, R. R. Tubbs, R. Levenson, *Modern Pathology* **2006**, *19*, 333A.
- [132] J. F. Hainfeld, R. D. Powell, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **2000**, *48*, 471.
- [133] R. Moller, R. D. Powell, J. F. Hainfeld, W. Fritzsche, *Nano Letters* **2005**, *5*, 1475.
- [134] T. Schueler, R. Kretschmer, S. Jessing, M. Urban, W. Fritzsche, R. Moeller, J. Popp, *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, *25*, 15.
- [135] B. Seise, A. Brinker, R. Kretschmer, M. Schwarz, B. Rudolph, T. Kaulfuss, M. Urban, T. Henkel, J. Popp, R. Moeller, *Engineering in Life Sciences* **2011**, *11*, 148.
- [136] L. Schwenkbier, S. Pollok, S. Koenig, M. Urban, S. Werres, D. Cialla-May, K. Weber, J. Popp, *Analytical Methods* **2015**, *7*, 211.
- [137] M. Moschallski, J. Baader, O. Prucker, J. Ruehe, *Analytica Chimica Acta* **2010**, *671*, 92.
- [138] G. Arrabito, B. Pignataro, *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 5450.
- [139] A. W. Peterson, R. J. Heaton, R. M. Georgiadis, *Nucleic Acids Research* **2001**, *29*, 5163.
- [140] A. S. Hoffman, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 3.
- [141] A. J. Bonham, T. Neumann, M. Tirrell, N. O. Reich, *Nucleic Acids Research* **2009**, *37*.
- [142] G. C. Le Goff, L. J. Blum, C. A. Marquette, *Macromolecular Bioscience* **2013**, *13*, 227.
- [143] T. Neumann, A. J. Bonham, G. Dame, B. Berchtold, T. Brandstetter, J. Ruehe, *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 6124.
- [144] M. Rendl, A. Boenisch, A. Mader, K. Schuh, O. Prucker, T. Brandstetter, J. Ruehe, *Langmuir* **2011**, *27*, 6116.
- [145] M. S. Rutowska, F. C. G. Gunning, F. Kivlehan, E. Moore, D. Brennan, P. Galvin, A. D. Ellis, *Measurement Science & Technology* **2010**, *21*.



- [146] D. Brennan, S. Dillmore, E. Moore, P. Galvin, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2009**, *142*, 383.
- [147] A. Bromberg, E. C. Jensen, J. Kim, Y. K. Jung, R. A. Mathies, *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 963.
- [148] J. Liu, D. Gao, H.-F. Li, J.-M. Lin, *Lab on a Chip* **2009**, *9*, 1301.
- [149] K. G. Olsen, D. J. Ross, M. J. Tarlov, *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 1436.
- [150] R. L. Srinivas, S. D. Johnson, P. S. Doyle, *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 12099.
- [151] R. A. Zangmeister, M. J. Tarlov, *Langmuir* **2003**, *19*, 6901.
- [152] C. L. Feng, G. J. Vancso, H. Schoenherr, *Advanced Functional Materials* **2006**, *16*, 1306.
- [153] O. Y. F. Henry, S. Kirwan, A. Mehdi Debela, C. K. O'Sullivan, *Electrochemistry Communications* **2011**, *13*, 1155.
- [154] N. W. Choi, J. Kim, S. C. Chapin, D. Thao, E. Donohue, P. Pandey, W. Broom, W. A. Hill, P. S. Doyle, *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 9370.
- [155] M. K. Kang, R. Huang, *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* **2010**, *58*, 1582.
- [156] Z. Xiao, M. Li, J. Zhou, *Acta Mechanica Solida Sinica* **2012**, *25*, 550.
- [157] H. B. Berney, K. Oliver, *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, *21*, 618.
- [158] B. Lillis, M. Manning, H. Berney, E. Hurley, A. Mathewson, M. M. Sheehan, *Biosensors & Bioelectronics* **2006**, *21*, 1459.
- [159] Y. Takashima, T. Sahara, T. Sekine, T. Kakuta, M. Nakahata, M. Otsubo, Y. Kobayashi, A. Harada, *Macromolecular Rapid Communications* **2014**, *35*, 1646.
- [160] R. D. Deegan, O. Bakajin, T. F. Dupont, G. Huber, S. R. Nagel, T. A. Witten, *Nature* **1997**, *389*, 827.
- [161] R. D. Deegan, O. Bakajin, T. F. Dupont, G. Huber, S. R. Nagel, T. A. Witten, *Physical Review E* **2000**, *62*, 756.
- [162] M. Egmont-Petersen, D. de Ridder, H. Handels, *Pattern Recognition* **2002**, *35*, 2279.
- [163] J. A. Rebhahn, C. Bishop, A. A. Divekar, K. Jiminez-Garcia, J. J. Kobie, F. E.-H. Lee, G. M. Maupin, J. E. Snyder-Cappione, D. M. Zaiss, T. R. Mosmann, *Computer Methods and Programs in Biomedicine* **2008**, *92*, 54.
- [164] Q. Liu, Y. Bai, Q. Ge, S. Zhou, T. Wen, Z. Lu, *Clinical Chemistry* **2007**, *53*, 188.
- [165] M. N. Leiske, M. Hartlieb, C. Paulenz, D. Pretzel, M. Hentschel, C. Englert, M. Gottschaldt, U. S. Schubert, *Advanced Functional Materials* **2015**, *25*, 2458.
- [166] D. P. Manage, J. Lauzon, G. Zahariadis, L. M. Pilarski, *Lab on a Chip* **2013**, *13*, 4087.
- [167] D. P. Manage, L. M. Pilarski, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2015**, *1310*, 175.
- [168] K. Albrecht, M. Moeller, J. Groll, "Nano- and Microgels Through Addition Reactions of Functional Oligomers and Polymers", in *Chemical Design of Responsive Microgels*, A. Pich and W. Richtering, Eds., 2010, p. 65.
- [169] K. Kempe, A. Krieg, C. R. Becer, U. S. Schubert, *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 176.
- [170] A. B. Lowe, *Polymer Chemistry* **2010**, *1*, 17.
- [171] Z. G. Wang, B. Ding, *Advanced Materials* **2013**, *25*, 3905.
- [172] L. Ferreira, M. H. Gil, J. S. Dordick, *Biomaterials* **2002**, *23*, 3957.
- [173] K. S. Anseth, S. M. Newman, C. N. Bowman, *Biopolymers* **1995**, *122*, 177.
- [174] K. A. Berchtold, J. Nie, J. W. Stansbury, B. Hacıoglu, E. R. Beckel, C. N. Bowman, *Macromolecules* **2004**, *37*, 3165.
- [175] K. T. Haraldsson, J. B. Hutchison, R. P. Sebra, B. T. Good, K. S. Anseth, C. N. Bowman, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2006**, *113*, 454.
- [176] J. B. Hutchison, K. T. Haraldsson, B. T. Good, R. P. Sebra, N. Luo, K. S. Anseth, C. N. Bowman, *Lab on a Chip* **2004**, *4*, 658.
- [177] P. M. Johnson, T. B. Reynolds, J. W. Stansbury, C. N. Bowman, *Polymer* **2005**, *46*, 3300.
- [178] D. Freidank, "3D-DNA chips: surface attached functional polymer networks as matrix for nucleic acid microarrays", 2005.
- [179] E. C. Friedberg, L. D. McDaniel, R. A. Schultz, *Current Opinion in Genetics & Development* **2004**, *14*, 5.
- [180] W. Yang, *Protein Science* **2011**, *20*, 1781.
- [181] G. M. Cruise, O. D. Hegre, D. S. Scharp, J. A. Hubbell, *Biotechnology and Bioengineering* **1998**, *57*, 655.
- [182] A. S. Sawhney, C. P. Pathak, J. A. Hubbell, *Biomaterials* **1993**, *14*, 1008.

- [183] T. Majima, W. Schnabel, W. Weber, *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **1991**, 192, 2307.
- [184] B. D. Fairbanks, M. P. Schwartz, C. N. Bowman, K. S. Anseth, *Biomaterials* **2009**, 30, 6702.
- [185] C. M. Soto, C. H. Patterson, P. T. Charles, B. D. Martin, M. S. Spector, *Biotechnology and Bioengineering* **2005**, 92, 934.
- [186] M. Kenney, S. Ray, T. C. Boles, *Biotechniques* **1998**, 25, 516.
- [187] D. A. Khodakov, N. V. Zakharova, D. A. Gryadunov, F. P. Filatov, A. S. Zasedatelev, V. M. Mikhailovich, *Biotechniques* **2008**, 44, 241.
- [188] C. Nilsson, N. Simpson, M. Malkoch, M. Johansson, E. Malmstrom, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2008**, 46, 1339.
- [189] P. Nilsson, B. Persson, M. Uhlen, P. A. Nygren, *Analytical Biochemistry* **1995**, 224, 400.
- [190] J. Letowski, R. Brousseau, L. Masson, *Journal of Microbiological Methods* **2004**, 57, 269.
- [191] E. Dugat-Bony, E. Peyretilade, N. Parisot, C. Biderre-Petit, F. Jaziri, D. Hill, S. Rimour, P. Peyret, *Environmental Microbiology* **2012**, 14, 356.
- [192] R. Dickman, F. Manyanga, G. P. Brewood, D. J. Fish, C. A. Fish, C. Summers, M. T. Horne, A. S. Benight, *Journal of Biophysical Chemistry* **2012**, 3, 1.
- [193] R. Peytavi, L. Tang, F. R. Raymond, K. Boissinot, L. Bissonnette, M. Biossinot, F. J. Picard, M. Quellette, G. Bergeron, *BioTechniques* **2005**, 39, 89.
- [194] R. D. Stedtfeld, L. M. Wick, S. W. Baushke, D. M. Tourlousse, A. B. Herzog, Y. Xia, J. M. Rouillard, J. A. Klappenbach, J. R. Cole, E. Gulari, J. M. Tiedje, S. A. Hashsham, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* **2006**, 73, 380.
- [195] D. R. Lane, M. J. Krug, S. F. Gonzalez, A. Warsen, *103rd General Meeting of the American Society for Microbiology* **2003**, Washinton, DC.
- [196] P. V. Riccelli, K. E. Mandell, A. S. Benight, *Nucleic Acids Research* **2002**, 30, 415.

## Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena, den

